

Etude des antigènes poliomyélitiques fixant le complément

Travail du Laboratoire d'Hygiène, Professeur R. SOHIER

T H E S E

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

LE 18 DÉCEMBRE 1964 PAR

Colette AMIEL

Née le 6 Juillet 1936, à THONON-LES-BAINS (Haute-Savoie)

Ex-Interne en Pharmacie, nommée Médaille d'Or des Hôpitaux de Lyon

Diplômée de Bactériologie, Hématologie, Parasitologie et Sérologie



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554212_0001

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année 1964 - N°

Etude des antigènes poliomyélitiques fixant le complément

Travail du Laboratoire d'Hygiène, Professeur R. SOHIER

T H E S E

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

LE 18 DÉCEMBRE 1964 PAR

Colette AMIEL

Née le 6 Juillet 1936, à THONON-LES-BAINS (Haute-Savoie)

Ex-Interne en Pharmacie, nommée Médaille d'Or des Hôpitaux de Lyon

Diplômée de Bactériologie, Hématologie, Parasitologie et Sérologie

- P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E -

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

P R O F E S S E U R S

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique Biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie Biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHLER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETLEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSSEL	Clinique Chirurgicale orthopédique et traumatologique
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie

MM. PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique Médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricale
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
X.....	Clinique des maladies infectieuses
X.....	Biologie médicale et pharmacodynamie
X.....	Clinique gynécologique
X.....	Thérapeutique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-Chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
SARROUY	Clinique de pédiatrie et puériculture
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie
PONT Maurice	Médecine générale

PROFESSEUR SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique Biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
De SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
TOLOT	Médecine du travail
GARIN	Parasitologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES TITULAIRES

MM. GREYSSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
PINET	Electro-radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique Biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
De MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
KALB	Pneumo-phtisiologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
RIFPAT	Hygiène
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
FLANDROIS	Physiologie
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie

AGREGES EN EXERCICE

MM. BONAMOUR	Ophtalmologie
COLIN	Médecine légale
De MOURGUES Georges	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale

MM. ¹ DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSÉ	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie

MARET	Chirurgie générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOËL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : M. le Professeur R. SOHIER

Assesseurs: MM.les Professeurs BADINAND
DORCHE

M. le Professeur-Agrégé FLEURETTE

A LA MEMOIRE DE MON. PERE

A MA MERE

A MA SOEUR

A TOUS LES MIENS

A N O T R E P R E S I D E N T D E T H E S E

Monsieur le Professeur R. SOHIER

Sa personnalité nous avait séduite et nous avons
été très heureuse qu'il nous accepte dans son laboratoire.

Nous lui exprimons toute notre reconnaissance et
notre souhait de compter encore parmi ses élèves.

A N O S J U G E S

Monsieur le Professeur BADINAND

Il fut notre premier maître dans les hôpitaux.
Sa ~~bien~~veillance nous a suivie tout au long de nos études.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre
gratitude et de notre profond attachement.

Monsieur le Professeur DORCHE

Nous avons particulièrement apprécié son dévouement
tant à la Faculté que comme maître d'Internat. Nous le remer-
cions bien vivement d'avoir accepté d'être notre juge.

Monsieur le Professeur-Agrégé FLEURETTE

Nous lui sommes très reconnaissante d'avoir accepté
de juger cette thèse.

A NOS MAITRES DE FACULTE

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

A M A D E M O I S E L L E Y. C H A R D O N N E T

Elle a conduit et épaulé ce travail. Nous la remercions bien vivement de nous avoir généreusement distribué son savoir, ses compétences et son amabilité.

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE D'HYGIENE

En remerciement pour sa participation
et son intérêt, et pour l'accueil chaleureux
qu'il nous a réservée.

A TOUS CEUX QUI ONT COLLABORE.

A MES CONFERENCIERS ET

CAMARADES D'INTERNAT

A MES AMIS.

- INTRODUCTION -

La réaction de fixation du complément a été et reste encore très largement utilisée pour le diagnostic des maladies à virus de l'homme. On admet même que, pour beaucoup d'entre elles, elle permet en l'absence d'isolement du virus, de préciser sa nature, si l'on dispose de deux sérums prélevés dans des délais convenables. En outre, elle apporte des éléments de présomption utiles par l'examen d'un seul sérum prélevé à partir du dixième jour après le début de la maladie, du moins pour certaines d'entre elles.

Toutefois cette réaction sérologique n'est que rarement employée pour la caractérisation de la poliomyélite en pratique courante et sa valeur diagnostique est discutée. Certains virologues estiment que les réactions hétérotypiques ne permettent pas dans un grand nombre de cas de caractériser le type de virus poliomyélitique en cause; de plus, l'existence de réactions croisées entre les différents entérovirus (poliomyélitique, Echo et Coxsackie) rend son interprétation difficile et diminue sa valeur diagnostique.

En fait, on constate que si l'emploi de la réaction de fixation du complément demeure très limité, c'est surtout en raison des difficultés d'obtention d'antigènes valables et aussi de la nécessité d'utiliser un antigène vivant avec les risques que cela comporte lors de la préparation et de la manipulation des souches pathogènes.

Le Laboratoire d'Hygiène s'étant intéressé aux problèmes concernant la préparation de ces antigènes ainsi qu'à l'interprétation des résultats, Monsieur le Professeur R. SOHIER nous a proposé de dresser un bilan des résultats obtenus et d'effectuer quelques recherches sur la purification de ces antigènes.

Après un bref historique des techniques proposées, nous exposerons donc celles qui ont été retenues, les modifications qui y ont été apportées et les résultats qu'elles ont donnés. Nous indiquerons ensuite nos essais de con-

centration et purification des antigènes poliomyélitiques, ainsi que quelques essais de floculation avec le virus poliomyélitique.

Nous n'étudierons pas les applications au diagnostic qui font l'objet de la thèse de Monsieur TERRAILLON (1964 - 123), mais le lecteur pourra s'y reporter, son travail et le nôtre se complétant.

*

*

*

CHAPITRE I

ETUDE DES ANTIGENES POLIOMYELITIQUES FIXANT LE COMPLEMENT

INTRODUCTION - HISTORIQUE

WOLLSTEIN (128) en 1908, date à laquelle le virus poliomyélitique n'était pas encore isolé, chercha à faire une réaction antigène-anticorps en utilisant le liquide céphalorachidien de sujet poliomyélitique comme antigène, mais en vain. Puis il utilisa des extraits d'organes de malades décédés de poliomyélite : moelle épinière, nerf sciatique, foie, muscles. Toutes les réactions restèrent négatives.

De même GAY et Coll. (37) en 1910 ne pouvaient observer de réaction ni dans le sérum, ni dans le liquide méningé de l'homme ou du singe malade.

C'est LEBREDO et Coll. (1910 - 59) qui, les premiers, auraient observé une fixation du complément au cours de la maladie poliomyélitique. Cette fixation fut retrouvée par KOLMER et Coll. (1917 - 53) et NEUSTAEDTER et Coll. (1917 - 75), mais plus facilement dans le liquide céphalorachidien que dans le sérum des malades.

La maladie étant alors inoculable au singe par voie intracérébrale, on se mit à utiliser comme source d'antigène la moelle épinière de cet animal qui présentait une maladie typique avec paralysie. Cependant les travaux sur le singe étant malaisés pour des raisons d'ordre technique et économique, on chercha à utiliser les muridés.

LORING et Coll. (1946 - 66 , 1947 - 67) substituèrent au singe le rat de coton dont cerveau et moelle lui fournissaient un antigène préparé par inoculation intracrânienne de virus Lansing, seule souche alors inoculable aux Muridés.

En 1951, CASALS et Coll. (18) réussissaient à adapter aux Muridés la souche MEET par passages successifs sur le souriceau de 3 à 4 jours. Cette souche était désormais utilisable et ils préparaient sur souriceaux des antigènes moins anticomplémentaires que ceux préparés sur souris adulte. Il semblait donc

que les tissus nerveux du souriceau, moins riches en lipides, étaient plus aptes à fournir des antigènes fixant le complément que ceux des animaux adultes. C'est ainsi que LE BOUVIER (56) en 1953 obtenait des résultats encourageants.

Parallèlement LAHELLE (1951 - 55) substituait au rat de coton utilisé par POLLARD et Coll. (1951 - 82 , 1951 - 83 , 1952 - 84) les mêmes animaux nouveaux-nés.

Les antigènes préparés sur organes d'animaux étaient de simples émulsions en eau distillée secondairement rendues isotoniques, ou en eau physiologique simple ou additionnée de 10 % de sérum de lapin (SELZER et Coll., 1954 - 105) ou encore des digestions dans l'alcool éthylique (KOLMER et Coll. 1917 - 53). Le tout était grossièrement purifié par centrifugation légère ou filtration (KOLMER et Coll. 1917 - 53).

Malheureusement les extraits d'organes d'animaux sains possédaient également le pouvoir plus ou moins grand de fixer le complément. ECKERT (1911 - 26) et SCHOTTMULLER (1912 - 101) trouvaient ainsi des réactions positives en utilisant des sérums de poliomyélitiques et des antigènes syphilitiques de Wassermann. Il s'avérait utile d'essayer de purifier ces antigènes.

Les émulsions furent traitées par des solvants des lipides:

- éther (SCHULTZ et Coll. 1931 - 102 , HARRISON 1939 - 49 , RAFFEL et Coll. 1940 - 86 , POLLARD 1951 - 82 , SELZER et Coll. 1954 - 105),
- chloroforme (SELZER et Coll. 1954 - 105),
- acétone-éther (CASALS 1949 - 16 , CASALS et Coll. 1950 - 17 , 1951 - 19 , LAHELLE 1951 - 55) furent proposés.

On essaya également de purifier le virus :

. soit par ultracentrifugation et reprise du culot (RAFFEL et Coll. 1940 - 86 , LORING et Coll. 1947 - 67 , POLLARD 1951 - 83 , SELZER et Coll. 1954 - 105),

. soit par précipitation de la fraction virale par modification du pH (SELZER et Coll. 1954 - 105) ou par addition d'alcool méthylique (POLLARD 1951 - 82),

. soit encore par précipitation des substances médullaires par l'acide citrique (RAFFEL et Coll. 1940 - 86),

. soit enfin par absorption du virus sur gel d'alunino (HARRISON 1939 - 49).

Cependant les réactions obtenues restaient bien souvent encore négatives ou trop faibles.

Les travaux de MERRILL (1936 - 70) étudiant l'influence des facteurs masse et concentration particulière dans les réactions immunologiques, expliquèrent les nombreux échecs obtenus dans la recherche d'anticorps fixant le complément en poliomyélite : le virus poliomyélitique étant très petit, il fallait supposer que les antigènes obtenus n'étaient pas assez riches en particules virales pour être actifs. On chercha donc à les concentrer.

Deux voies d'enrichissement étaient possibles : soit augmenter la libération des particules virales dans l'émulsion à partir des cellules nerveuses, soit concentrer la suspension de virus, les deux méthodes pouvant être mises en oeuvre successivement.

La destruction des cellules nerveuses fut envisagée par action de la trypsine (NEUSTAEDTER et Coll. 1917 - 75 , SCHULTZ et Coll. 1931 - 102 , KOLMER et Coll. 1935 - 54 , HARRISON 1939 - 49) ou par congélations et décongélations successives (HARRISON 1939 - 49 , LORING et Coll. 1942 - 65 , 1946 - 66 , 1947 - 67 , POLLARD 1951 - 82 , 1951 - 83 , POLLARD et Coll. 1952 - 84 , LE BOUVIER 1953 - 56).

Enfin de nombreuses méthodes de concentration du liquide obtenu furent essayées, mais sans résultat :

- distillation sous vide (HARRISON 1939 - 49 , RAFFEL et Coll. 1940 - 86),

- pervaporation (RAFFEL et Coll. 1940 - 86),

- lyophilisation (HARRISON 1939 - 49 , RAFFEL et Coll. 1940 - 86 , POLLARD 1951 - 83),

- ultracentrifugation (RAFFEL et Coll. 1940 - 86 , LORING et Coll. 1947 - 67 , POLLARD 1951 - 83 , SELZER et Coll. 1954 - 105).

Toutes ces méthodes s'avérèrent inefficaces, n'augmentant pas la fixation du complément obtenue et parfois même faisant disparaître tout pouvoir infectieux.

Les antigènes préparés sur organes animaux ne donnèrent jamais de bons résultats, sans doute en raison de l'énorme masse de matériel animal inutile qu'ils contenaient en regard à une faible fraction antigénique. Ils étaient souvent anticomplémentaires, non spécifiques et très peu sensibles. Aussi lorsqu'apparurent les cultures de tissus, ils tombèrent dans l'oubli.

Dès 1913 LEVADITI (62), (63) et FLEXNER et Coll. (33) arrivaient à maintenir en culture in vitro pendant 21 jours des organes d'homme ou de singe décédés de poliomyélite. Mais à partir de 1933 la méthode des tubes roulants (GEY 1933 - 38) permettait d'allonger ce temps de survie et même d'assurer la croissance de cellules à partir d'explants, ces cellules pouvant être repiquées en subcultures et servir de support à une multiplication virale.

Jusqu'en 1942 la culture in vitro du virus poliomyélitique devait répondre à deux exigences cellulaires :

- seules les cellules embryonnaires étaient capables de se maintenir et de se multiplier in vitro :

- seules des cellules de tissus nerveux étaient sensibles au virus poliomyélitique (SABIN et Coll. 1936 - 91).

En 1949 ENDERS et Coll. (29) réussissaient à cultiver le virus poliomyélitique souche Lansing sur des tissus épithéliaux de peau ou d'intestin d'embryons humains. Les tissus extraneuraux étaient donc également capables d'assurer la croissance du virus poliomyélitique. De même WELLER et Coll. (1949 - 126) cultivaient la souche Brunhilde sur du tissu prépuce d'homme adulte. De très nombreux tissus furent expérimentés, mais on retint essentiellement :

. les tissus embryonnaires (MILZER et Coll. 1950 - 71)

. les tissus d'homme ou de singe rénaux (WOOD et Coll. 1952 - 129) ou testiculaires et prépuçiaux (SMITH et Coll. 1950 - 107 , 1951 - 108, SYVERTON et Coll. 1952 - 119).

Ces différents tissus permirent le maintien en culture et la multiplication de différentes souches poliomyélitiques :

* Lansing (ENDERS et Coll. 1949 - 29 , WELLER et Coll. 1949 - 126),

* Brunhilde (WELLER et Coll. 1949 - 126 , ROBBINS et Coll. 1950 38),

* Mahoney (SCHERER et Coll. 1951 - 93),

* Y - SK (SYVERTON et Coll. 1951 - 118 , SCHERER et Coll. 1951 - 93 , LEDINKO et Coll. 1951 - 60),

* Leon (WELLER et Coll. 1952 - 127),

*Saukett (YOUNGNER et Coll. 1952 - 130),

* MEFTI (WOOD et Coll. 1952 - 129).

Les milieux de croissance et de survie étaient des solutions salines équilibrées enrichies par des liquides animaux complexes :

- liquide d'ascite (FLEXNER et Coll. 1915 - 33),
- sérum de cordon ombélical (GEY et Coll. 1936 - 39),
- sérum de singe (GIDEMEISTER 1933 - 41)
- sérum de boeuf (SANDERS et Coll. 1942 - 92),
- sérum de veau (ENDERS et Coll. 1949 - 29),
- sérum de cheval (ROBBINS et Coll. 1951 - 89),
- extrait d'embryon de poulet (ROBBINS et Coll. 1950 - 88),
- extrait d'embryon de boeuf (WELLER et Coll. 1952 - 127).

WOOD et Coll. 1952 (129) utilisaient un milieu synthétique de composition définie par MORGAN et Coll., le milieu M 199 (1950 - 74).

Seul SVEDMYR et Coll. (1952 - 114) appliquèrent ces méthodes à l'obtention d'un antigène poliomyélitique fixant le complément.

Avec les travaux de SCHERER et Coll. (1953 - 94), de SYVERTON et Coll. (1953 - 120) une nouvelle voie plus fructueuse s'ouvrait : des cellules dites Hela isolées à partir d'un carcinome humain de l'utérus par GEY (1952 - 40) se révélèrent particulièrement intéressantes, car se reproduisant facilement et indéfiniment par culture in vitro dans des conditions appropriées. Elles sont actuellement maintenues en culture depuis cette date. Adaptées à la culture en couche dite "monocellulaire", elles se révélèrent très sensibles au virus poliomyélitique (SCHERER et Coll. 1953 - 94 , SYVERTON et Coll. 1953 - 120 , 1954 - 121).

De même isolées par la technique des explants sur plasma de poulet à partir d'un carcinome du larynx (MOORE et Coll. 1955 - 72), les cellules HEp2 furent maintenues en lignée continue par FJELDE et Coll. (1955 - 32).

De même encore les cellules KB isolées par EAGLE (1955 - 24) par trypsination de fragments d'un carcinome du plancher de la bouche sont maintenues en culture continue par trypsinations successives selon les conditions techniques de YOUNGNER (1954 - 131).

Enfin le virus poliomyélitique peut être cultivé sur couche "monocellulaire" de cellules en primoculture, c'est-à-dire obtenues directement par trypsination d'organes fraîchement prélevés. C'est le cas des cellules amniotiques humaines (GAUDIN 1960 - 36) et des cellules de rein de singe Vervet, Babouin ou Cynomolgus que nous avons utilisées.

Les travaux sur les antigènes poliomyélitiques fixant le complément que nous décrirons se rapportent entièrement aux cultures de tissus en couche "monocellulaire", technique généralement adoptée par les laboratoires en raison de ses nombreux avantages :

- rapidité de la croissance cellulaire,
- survie prolongée des cellules avec possibilité de subcultures et de lignées continues,

- observation facile,
- grande sensibilité des cellules aux virus,
- et bonne multiplication de ces virus.

*

*

*

MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR LA PREPARATION ET LE
TITRAGE DES ANTIGENES ETUDIES

A - MATERIEL POUR L'OBTENTION DES ANTIGENES -

1°/- Cellules T :

Les cellules T sont utilisées au laboratoire pour la détermination du titre infectieux des antigènes poliomyélitiques.

Elles proviennent de la trypsination des cultures d'implants de fragments de rein normal d'un enfant de cinq ans (Van der VLIEN et Coll. 1958 - 124) et sont entretenues en lignée continue depuis 1958.

Elles sont obtenues au laboratoire d'hygiène par trypsination et mise en culture en tubes à raison de 25 à 30 000 cellules dans 1 ml du milieu de croissance suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g.
Carbonate acide de sodium	117,6	mg.
Glutamine	10,75	mg.
Sérum de veau	50	ml.
Solution saline équilibrée de Hanks	qsp	1 l.

additionné de rouge de phénol, d'antifongique et d'antibiotiques aux concentrations habituelles :

Rouge de phénol	19,9	mg/l.
Pénicilline	1 000 000	unités/l.
Bacitracine	10 000	unités/l.
Mycostatine	50 000	unités/l.
Streptomycine	50 000	microgr./l.
Néomycine	75 000	microgr./l.

Après 2 jours de culture à 36° C. dans ce milieu, les cellules sont utilisées pour le titrage infectieux des antigènes.

2°/- Cellules KB :

Les cellules KB ont été isolées par trypsination (EAGLE, 1955 - 24) de fragments de carcinome du plancher de la bouche dans les conditions décrites par YOUNGNER (1954 - 131). Elles sont entretenues en lignée continue depuis 1955.

Les repiquages se font par trypsination des nappes de cellules (*) avec pour milieu de croissance le milieu suivant utilisé au laboratoire d'hygiène :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g.
Glucose	450	mg.
Extrait de levure Difco	1	g.
Carbonate acide de sodium	1,1	g.
Solution saline équilibrée de Earle	qsp	1 l.
additionné de rouge de phénol, d'antibiotiques et de 10 % de sérum de veau.		

3°/- Cellules de rein de singe :

Les cellules de rein de singe sont obtenues en primoculture selon la technique de YOUNGNER (1954 - 131). Les reins de singe (*Erythrocebus Patas* ou *Macacuscynomolgus*) sont prélevés, fragmentés, trypsinisés, puis les cellules sont mises en culture dans le milieu de croissance suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g.
Carbonate acide de sodium	98	mg.
Sérum de veau	20	ml.
Solution saline équilibrée de Hanks	qsp	1 l.
additionné de rouge de phénol et d'antibiotiques.		

Après sept jours sans changer de milieu, on obtient une nappe de

(*) - obligeamment fournies par le Docteur BOUE.

cellules confluentes propres à recevoir le virus.

4°/- Cellules Hela :

Les cellules Hela ont été isolées par GEY et Coll. (1952 - 40) à partir d'implants de carcinome humain du col de l'utérus. Elles sont maintenues en lignée continue depuis cette date. Elles sont entretenues au laboratoire d'hygiène en culture en couche monocellulaire par repiquages successifs (trypsination ou versination) dans un milieu de croissance contenant soit du sérum humain (*), soit du sérum de poulain ou de veau (**).

a)- Cellules Hela en sérum humain :

Les cellules sont ensemencées en fioles carrées de 250 ml à raison de 4 à 8 millions de cellules par boîte. Elles se multiplient rapidement à 36° C dans le milieu de croissance suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g.
Extrait de levure Difco	0,1	g.
Carbonate acide de sodium	2,1	g.
Bactotryptose Difco	5	g.
Sérum humain	400	ml.
Solution saline équilibrée de Earle	qsp	1 l.

additionné de rouge de phénol et d'antibiotiques.

Après 48 heures le milieu de croissance est remplacé par le même milieu frais. Après 4 jours (exceptionnellement 3 ou 5), on obtient une nappe confluyente monocellulaire recouvrant la boîte propre à recevoir le virus.

b)- Cellules Hela en sérum de veau ou de poulain :

Les fioles de culture sont ensemencées à raison de 7 millions de cellules pour les fioles de Kolle et de 14 millions de cellules pour les fioles de Roux de 1 litre.

(*) - cellules remises par le Docteur SVEDMYR.

(**) - cellules remises par le Docteur SYVERTON.

Le milieu de croissance est le suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5 g.
Extrait de levure Difco	1 g.
Carbonate acide de sodium	1,1 g.
Glucose	450 mg.
Sérum de veau ou de poulain	100 ml.
Solution saline équilibrée de Earle qsp	1 L.

additionné de rouge de phénol et d'antibiotiques.

Après 3 à 4 jours d'incubation à 36° C, la nappe cellulaire est confluyente et prête à recevoir le virus.

5°/- Cellules HEp2 :

Les cellules HEp2 ont été isolées à partir d'un carcinome du larynx par MOORE et Coll. (1955 - 72). Elles sont maintenues en lignée continue depuis cette date.

Au laboratoire d'hygiène (*) elles sont entretenues par repiquages successifs et trypsination. Les cellules sont ensemencées en boîte de Roux de 1 litre à raison de 8 à 10 millions de cellules par boîte dans 100 ml du milieu de croissance suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5 g.
Carbonate acide de sodium	1,489 g.
Glucose	900 mg.
Sérum de veau	100 ml.
Solution saline équilibrée de Hanks qsp	1 l.

additionné de rouge de phénol et d'antibiotiques.

Après 3 jours d'incubation à 36° C la nappe cellulaire est confluyente et "monocellulaire".

N.B./- Les différentes techniques de récolte des antigènes polionyémitiques sont envisagées en détail dans ce travail. Elles seront détaillées aux chapitres correspondants.

(*) - Cellules remises par le Docteur PERKINS.

B - METHODE DE TITRAGE DES ANTIGENES UTILISES -

1°/- Fixation du complément :

Le laboratoire d'hygiène utilise la microméthode de SOHIER et coll. (1956 - 112), adaptation de la méthode classique de KOLMER qui présente l'intérêt d'être économique et pratique.

Matériel :

- eau distillée sur verre (eau bi-distillée).

- Solution tampon au véronal (*). Cette solution type Mayer-Croft (69) avec calcium et magnésium de pH 7,2 est préparée extemporanément par dilution au 1/5 en eau bidistillée de la solution mère suivante :

Chlorure de sodium	85	g.
Diéthylmalonylurée	5,75	g.
Diéthylmalonylurée sodique	3.75	g.

Dissoudre l'acide dans 500 ml d'eau bidistillée. Ajouter le chlorure de sodium et le véronal sodique. Compléter à 2 000 ml. Ajouter :

Chlorure de magnésium	1,68	g.
Chlorure de calcium	0,28	g.

Autoclaver vingt minutes à 105° C. Conserver à + 4° C.

- Complément : sérum de plusieurs cobayes mâles, conservés à - 25° C ,
- 50° C.

- Hématies : suspension d'hématies de mouton conservées par dilution à parties égales dans la solution d'Alsever suivante :

Glucose anhydre	20,05	g.
Chlorure de sodium	8	g.
Citrate trisodique 5H ₂ O	4,2	g.
Eau distillée qsp	1 000	ml.

(*) - Lire désormais solution T.V.

Ajuster le pH à 6,1 avec une solution d'acide citrique à 5 %. Stériliser 3 jours de suite à 30 minutes à 100° C.

Le jour de leur emploi, les hématies sont lavées trois fois et diluées à 2 % du culot dans la solution T.V.

- Sérum hémolytique : concentré de l'Institut Pasteur de Paris.

- Antigènes à titrer :

Les antigènes poliomyélitiques sont préparés sur cultures cellulaires selon une technique décrite aux chapitres correspondants. Ils sont conservés à - 20° C et centrifugés avant l'emploi à 3 000 tours/minute pendant 10 minutes.

- Antigènes de référence :

Ce sont des antigènes de titre connu qui sont engagés dans chaque réaction. La réaction n'est valable que si les sérums de référence retrouvent avec eux leur titre.

- Antigènes témoins :

Dans chaque réaction on vérifie l'absence d'anticorps non spécifiques fixant le complément dans nos sérums de référence en utilisant des antigènes préparés parallèlement aux antigènes viraux mais dépourvus de virus.

- Sérums de référence positifs :

Ce sont des sérums humains de convalescents possédant un titre élevé d'anticorps spécifiques et ne possédant pas d'anticorps hétérotypiques.

- Sérums de référence négatifs :

Ce sont des sérums humains connus comme ne possédant pas d'anticorps fixant le complément.

Technique :

1°/- Préparation des dilutions de complément :

Préparer trois portoirs de 12 trous (A, B, C,) contenant chacun 5 tubes à hémolyse.

Répartir le solution T.V. de la façon suivante :

- Galerie A : Tube A1 : 1 ml; A2 : 1,25 ml; A3 : 1,50 ml; A4 : 1,75 ml
A5 : 2 ml.
- Galeries B et C: 0,50 ml dans tous les tubes.

Faire une dilution du complément au 1/5. Ajouter à chacun des tubes de la galerie A 0,25 ml de complément dilué au 1/5.

Passer ensuite du dernier tube de la galerie A 0,50 ml dans le dernier tube de la galerie B, puis après mélange, 0,50 ml de ce dernier tube de la galerie B dans le dernier tube de la galerie C. Refaire la même opération pour l'avant dernier tube de la galerie A, dont on passe 0,50 ml dans l'avant dernier tube de la galerie B puis 0,50 ml de ce tube dans l'avant dernier tube de la galerie C, et ainsi de suite en remontant jusqu'au premier tube de la galerie A.

On obtient alors le dispositif suivant (tableau I) :

A C' dilué au 1/5 sol. T.V. Dilution obtenue	0,25 1 (1/25) ↓	0,25 1,25 (1/30) ↓	0,25 1,50 (1/35) ↓	0,25 1,75 (1/40) ↓	0,25 2 (1/45) ↓
B C' dilué (tube correspondant de A) Sol. T.V. Dilution obtenue	0,50 0,50 (1/50) ↓	0,50 0,50 (1/60) ↓	0,50 0,50 (1/70) ↓	0,50 0,50 (1/80) ↓	0,50 0,50 (1/90) ↓
C C' dilué (tube correspondant de B) Sol. T.V. Dilution obtenue	0,50 0,50 (1/100)	0,50 0,50 (1/120)	0,50 0,50 (1/140)	0,50 0,50 (1/160)	0,50 0,50 (1/180)

2°/- Titrage de l'activité du complément en présence des antigènes :

Le but de ce titrage est de déterminer la dose de complément qui permet l'hémolyse totale en présence de chaque antigène qui sera utilisé dans la réaction. Il est effectué pour chaque dilution d'antigène qui sera utilisée dans la réaction. On dispose 15 tubes spéciaux sur un portoir placé parallèlement à celui sur lequel on a disposé les dilutions progressives du complément et on répartit dans chacun d'eux successivement :

- complément dilué II gouttes de chacune des dilutions en commençant par la dilution la plus élevée,
- antigène ou dilution d'antigène II gouttes,
- solution T.V. I goutte.

Après une heure de séjour au bain-marie à 37° C, on ajoute :

- mélange (préparé 10 minutes à l'avance) à parties égales d'hématies de la suspension à 2 % du culot et du sérum hémolytique contenant deux unités hémolytiques dans II gouttes. On replace au bain-marie à 37° C pour une heure mais on refait une première lecture après trente minutes et une deuxième après une heure.

L'unité de complément est donnée par la dilution qui provoque l'hémolyse totale après une heure.

Pour la réaction, on utilise deux unités de complément dans II gouttes.

3°/- Réaction :

a)- Préparation des éléments de la réaction :

- Dilution des sérums de référence :

Elle est faite de 1/2 en 1/2 à l'aide d'un rhéomètre de Vernes à partir d'une dilution au 1/4 par reports successifs de 0,2 ml dans 0,2 ml de solution T.V.

- Dilution de l'antigène :

L'antigène viral est utilisé non dilué puis dilué de 1/2 en 1/2

dans la solution T.V. L'antigène témoin est utilisé non dilué.

- Complément :

Il est dilué dans la solution T.V. selon un rapport déterminé par le titrage préalable et de façon à avoir deux unités dans II gouttes. Par exemple (tableau 4) pour l'antigène 3 204 c, le complément est dilué au 1/25.

- Hématies :

Dix minutes avant l'emploi, on mélange à parties égales un volume de suspension d'hématies à 2 % du culot et un volume de sérum hémolytique contenant deux unités hémolytiques dans II gouttes.

b) - Mise en place des éléments de la réaction :

La méthode utilisée au laboratoire d'hygiène est inspirée de celle préconisée par BOERNER et LUKENS (1937 - 13) pour le titrage de l'antigène syphilitique. Pour chaque antigène à titrer, nous utilisons trois sérums dits de référence dont le titre préalablement déterminé en présence d'un antigène de référence est nul pour le premier (témoin négatif), moyen pour le deuxième et fort pour le troisième, (ce sont des mêmes sérums de référence qui sont introduits à titre de contrôle dans chaque épreuve de diagnostic en série).

On dispose pour chaque titrage d'antigène de 19 tubes dont 7 pour l'antigène en présence des dilutions de sérum, 2 pour les témoins sérums (sérum dilué au 1/4 et au 1/8) et 10 pour les témoins généraux (Tableau 2). Ceux-ci comprennent un témoin antigène, un témoin hématies et huit témoins de couple hémolytique. Ces témoins généraux sont destinés à contrôler le système hémolytique utilisé, à vérifier que le complément est bien présent à deux unités à la fin de la réaction, enfin que l'antigène n'a pas de pouvoir anticomplémentaire ni de pouvoir hémolytique.

La fixation se fait une nuit à + 4° C et la révélation de la réaction par trente minutes de bain-marie à 37° C.

Pour le titrage des sérums, les modalités sont strictement identiques. Le sérum à expertiser remplace le sérum de référence et on utilise alors

TABLEAU 2

Fixation du complément. Titrage d'un antigène poliomyélitique

	TITRAGE							TEMOINS SERUMS		TEMOINS GENERAUX									
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$										
Dilution de sérum (I goutte)	I	I	I	I	I	I	I	I	I										
Antigène ou dilution (II gouttes)	II	II	II	II	II	II	II			II		II		II		II		II	
Complément (2 unités dans II gouttes)	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II								
Complément (1,5 unité dans II gouttes)													II	II					
Complément (1 unité dans II gouttes)															II	II			
Complément (0,75 unité dans II gouttes)																	II	II	
Solution tampon véronal								II	II	I	III	I	III	I	III	I	III	I	V
Fixation une nuit à + 4°C																			
Hématies à 2 % sensibilisées à 2 unités de sérum hémolytique	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
30 minutes à 37°C																			

un antigène de référence.

c)- Lecture :

Elle s'exprime en croix (de 0 à 4 croix) traduisant l'opacité due aux hématies intactes après remise en suspension (donc l'inverse de l'hémolyse).

On surveille le déroulement de la réaction et on fait une première lecture dès que l'hémolyse est totale dans les témoins généraux (complément à deux unités et 1,5 unités) et les témoins sérums.

On refait une deuxième lecture après trente minutes. On peut se contenter de cette dernière lecture qui donne de très bons résultats.

d)- Interprétation :

- antigène anticomplémentaire (*) :

L'hémolyse n'est pas totale dans les témoins généraux contenant deux unités et 1,5 unités de complément et l'on peut observer une fixation du complément en présence de sérum de référence négatif. L'antigène est alors déclaré anticomplémentaire, donc impropre à la réaction de fixation du complément (voir exemple tableau 3).

- antigène "utilisable" ou "bon" :

Il n'est pas anticomplémentaire et mis en présence des sérums de référence, il permet à ceux-ci de retrouver leur titre (**). C'est le cas de l'antigène 3 204 c dilué au 1/3 et au 1/6 (tableau 4). La dilution au 1/6 représente alors une unité d'antigène. On l'utilise dans la réaction dilué au 1/3 (deux unités d'antigène).

- antigène "faible" :

L'hémolyse est totale dans les témoins généraux contenant deux unités et 1,5 unités de complément ainsi qu'en présence de sérum négatif: l'antigène n'est donc pas anticomplémentaire. Mais l'antigène est dit "faible" car, même non dilué, il ne permet pas aux sérums de référence de retrouver leur titre (**).

(**)- exprimé par la plus forte dilution qui donne en présence de l'antigène de référence 50 % d'hémolyse .

(*) - Le pouvoir anticomplémentaire exprime la capacité d'un antigène ou d'un sérum à dévier le complément en l'absence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques correspondants.

TITRAGE D'UN ANTIGENE POLIOMYELITIQUE ANTICOMPLEMENTAIRE

Dilutions de complément	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{120}$	$\frac{1}{140}$
Antigène 1208 dilué 1/4	0	0	0	0	±	1	1	2	2	3

	DILUTIONS DES SERUMS							TEMOINS SERUMS		TEMOINS GENERAUX					
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	2 unités	1,5 unité	1 unité	0,75 unité		
S1	1	1	0	0	0	0	0	0	0						
S2	4	4	4	4	4	3	1	0	0	2	0	4	0		
S3	1	1	2	2	3	3	2	0	0						

S1 : sérum de référence titrant 0
 S2 : sérum de référence titrant 16
 S3 : sérum de référence titrant 32

TABLEAU 4

TITRAGE D'UN ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Titration de l'activité
du complément
en présence
de l'antigène

Dilutions de complément	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{35}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{45}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$
3204c dilué 1/3	0	0	0	0	0	±	±	±	±
3204c dilué 1/6	0	0	0	0	0	±	±	±	±
3204c dilué 1/8	0	0	0	0	0	±	±	±	±

Titration de l'antigène

	DILUTIONS DES SERUMS							TEMOINS SERUMS		Dilu- tions de l'anti gène 3204c	TEMOINS GENERAUX							
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$		2 unités	1,5 unité	1 unité	0,75 unité				
S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/3	0	0	0	0	±	±	1	1
S2	4	4	4	3	±	0	0	0	0		0	0	0	±	±	1	1	
S3	4	4	4	4	4	2	±	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/6	0	0	0	0	±	±	1	1
S2	4	4	3	2	±	0	0	0	0		0	0	0	±	±	1	1	
S3	4	4	4	4	4	3	±	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/8	0	0	0	0	±	±	1	1
S2	4	3	2	±	0	0	0	0	0		0	0	0	±	±	1	1	
S3	4	4	4	4	3	2	±	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0

S1 : sérum de référence titrant 0
 S2 : sérum de référence titrant 16-32
 S3 : sérum de référence titrant 64

2°/- Titration du pouvoir infectieux des antigènes poliomyélitiques :

Matériel :

- Tubes de culture cellulaire :

On utilise les cultures de cellules T décrites page 11 pour lesquelles on utilise le milieu de survie suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g.
Carbonate acide de sodium	117,6	mg.
Glutamine	10,75	mg.
Liquide amniotique de bovidés	300	ml.
Solution saline équilibrée de Hanks qsp	1	l.

additionné de rouge de phénol et d'antibiotiques.

- Antigènes à titrer :

Ce sont des antigènes préparés en vue d'une fixation du complément ou de l'étude de la concentration et de la purification des antigènes, ou encore en vue de réactions de floculation. Ils sont décrits respectivement aux différents chapitres de cet ouvrage. Leur conservation se fait à - 20° C.

- Antigènes de référence :

Ce sont des antigènes de titres connus engagés au cours du titrage afin de vérifier la valeur du titrage en cause : leur titre infectieux doit être retrouvé pour que le titrage soit valable.

- Sérums neutralisants :

Ce sont des sérums de cobayes hyperimmunisés dont le titre moyen est de 195 lorsqu'ils sont laissés en contact avec le virus de référence pendant 3 heures à 37° C.

Technique :

Le virus est dilué de 10^{-1} à 10^{-9} dans le milieu de survie. Les tubes de culture cellulaire sont vidés de leur milieu de survie, puis reçoivent

successivement :

0, 9 ml de milieu de survie frais

0,1 ml de la dilution de virus.

On inocule 5 à 10 tubes par dilution. La lecture est faite 1, 4 et 7 jours après l'inoculation.

Expression des résultats :

On détermine la dose infectieuse par ml sur culture de tissus 50 % (DICT 50) selon la méthode de REED et Coll. (1938 - 87).

- R E S U L T A T S -

A - ANTIGENES BRUTS -

I - Antigènes préparés selon une technique de SVEDMYR -

Dix-sept antigènes ont été préparés selon une technique de SVEDMYR (1957 - 117) ne comportant pas d'ultrafiltration sur filtre de collodion, contrairement aux antigènes préparés préalablement par SVEDMYR et ses collaborateurs (1952 - 114 , 1953 - 115).

La présente technique utilise les cellules Hela cultivées sur 10 à 40 % de sérum humain, inoculées à quatre jours avec un milieu de survie contenant du liquide amniotique de bovidés, du bactotryptose et du glucose.

a)- Les souches :

Il a été préparé :

- 6 antigènes de type I avec la souche Brunhilde,
- 8 antigènes de type 2 avec la souche Statler de SCHMIDT,
- 3 antigènes de type 3, un avec la souche Mac Mullen de SCHMIDT et deux avec la souche Saukett de SYVERTON.

b)- L'inoculat :

Les titres de suspensions de virus utilisées pour l'inoculation des cellules sont connus pour trois antigènes seulement. Ils sont respectivement de $10^{-7,5}$ / ml, $10^{-8,62}$ /ml et $10^{-8,62}$ /ml. Les autres stocks de virus ayant été obtenus dans des conditions identiques et nos travaux antérieurs nous l'ayant démontré, on peut admettre que leurs titres infectieux sont du même ordre.

Le virus est inoculé non dilué à raison de 0,10 à 0,25 ml (soit 10^{-7} à $10^{-7,4}$ DICT 50) par boîte contenant 8 à 10 ml de milieu de survie. Cependant deux antigènes ont été préparés avec 0,10 et 0,15 ml (soit 10^{-6} à $10^{-6,2}$ DICT 50) de dilution au 1/10 du virus dans le milieu de survie, afin d'assurer

une meilleure dispersion des particules virales. Dans l'un et l'autre cas, la qualité de l'antigène fixant le complément obtenu ne semble pas en rapport avec l'inoculat.

c)- Les cellules :

Les cellules utilisées sont des cellules Hela cultivées en sérum humain (*). Lorsque la nappe cellulaire est confluyente, le milieu de croissance est alors rejeté et les cellules sont lavées trois fois par contact de 10 à 30 minutes avec 30 ml de solution de PBS (DULBECCO et Coll., 1954 - 22). Le dernier liquide de lavage est entièrement ôté à la pipette; le virus est rajouté puis les cellules sont alors recouvertes par 8 à 10 ml du milieu de survie suivant additionné d'antibiotiques : liquide amniotique de bovidés contenant 5 g/l de bactotryptose (Difco) et 9 g/l de glucose. Dans trois cas ce milieu est additionné de 2 % de sérum de singe inactivé 30 minutes à 56° C sans que les résultats obtenus soient modifiés.

Après agitation douce à la main, les boîtes sont remises à l'étuve à 36° C en position stationnaire.

d)- Récolte :

Chaque jour les cellules sont observées au microscope grossissement 20 environ. Lorsque la dégénérescence est supérieure à 90 %, les cellules sont remises en suspension à la pipette et le liquide est réparti puis congelé à - 20° C.

Pour l'emploi, il est décongelé et soumis à une centrifugation de 3 000 tours par minute pendant 10 minutes afin d'ôter les débris cellulaires. C'est le surnageant qui constitue l'antigène utilisé directement sans chauffage ni concentration, contrairement à SVEDMYR qui chauffait une heure à 56° C ses antigènes.

e)- Résultats :

Sur 17 antigènes préparés, 10 se révélèrent inutilisables en fixation du complément, soit parce qu'anticomplémentaires (7/10), soit parce que d'activité nulle ou trop faible.

(*) - Voir page 13

Parmi les 7 antigènes utilisables, un seul pouvait être utilisé dilué au 1/2 - deux gouttes, deux étaient utilisés non dilués - une goutte, et quatre étaient utilisés non dilués - deux gouttes (**).

Si l'on considère les différents types de virus, la proportion de résultats favorables est variable :

Type 1 : 4 antigènes sur 6 sont utilisables (*) avec la souche Brunhilde,

Type 2 : 2 antigènes sur 8 sont utilisables avec la souche Statler.

Type 3 : 1 antigène sur 1 est utilisable avec la souche Mac Mullen
0 antigène sur 2 est utilisable avec la souche Saukett .

Il semble que la qualité des antigènes obtenus est supérieure pour le type 1. A l'exception de cette différence d'action entre les types, il ne semble pas que nous puissions expliquer ou prévoir les échecs pour tel ou tel antigène.

f)- Conclusions :

Les antigènes obtenus selon la technique de SVEDMYR étaient donc facilement anticomplémentaires et d'activité insuffisante. Afin d'y remédier, SVEDMYR concentrait ses antigènes par ultrafiltration et ôtait le pouvoir anticomplémentaire en les chauffant 60 minutes à 56° C, traitement qui avait l'avantage de les rendre non infectieux, donc non dangereux pour le manipulateur.

Cependant Le BOUVIER et Coll. (1955 - 133), SCHMIDT et Coll. (1956 - 96) ayant montré que le chauffage augmentait l'hétérotypie des réactions tout en diminuant leur sensibilité, et l'ultrafiltration étant fastidieuse à mettre en oeuvre, il nous est apparu utile de chercher à améliorer le rendement et la qualité de l'antigène en agissant directement au niveau de sa production.

C'est ainsi que des techniques inspirées des travaux de SCHMIDT et Coll. (1955 - 95 , 1957 - 97 , 1957 - 98) ont été utilisées.

(**) - On utilise deux unités d'antigène dans la réaction de fixation du complément. 1/2 - deux gouttes correspond à un antigène dont une unité antigénique se trouve dans deux gouttes d'une dilution au 1/4. Voir page 15

(*) - Voir page 21

II - Antigènes préparés d'après la technique de SCHMIDT -

1°/- Technique originale :

La technique originale de SCHMIDT est décrite dans les articles suivants : SCHMIDT et Coll. (1956 - 96 , 1957 - 97, 1957 - 98).

a)- Les souches :

Les souches utilisées sont :

- Type 1 : souche Mahoney
- Type 2 : souche Statler
- Type 3 : souche Mac Mullen.

b)- L'inoculat :

Le virus est inoculé dilué au 1/10 dans le milieu de survie à raison de 0,5 ml par boîte contenant 8 ml de milieu de survie.

c)- Les cellules :

Les cellules Hela sontensemencées (1 million) dans des flacons carrés de 200 ml contenant 10 ml du milieu de croissance suivant :

Hydrolysate de lactalbumine	5	g/l
Glucose	4,5	g/l
Extrait de levure	1	g/l
Bicarbonate de sodium	1,1	g/l
Solution de Earle	qsp	1 l.

auquel on ajoute du rouge de phénol, des antibiotiques et 10 % de sérum de poulain.

Les cultures sont placées à 36° C.

Le deuxième jour on rajoute 5 ml de milieu de croissance.

Le cinquième jour les boîtes sont vidées puis additionnées de 10 ml de milieu de croissance frais.

Le septième jour, on rajoute 5 ml de milieu de croissance.

Le neuvième jour, la croissance a donné de 15 à 20 millions

de cellules. Celles-ci sont lavées deux fois avec 10 ml de la solution de Hanks qui est ensuite rejetée. On ajoute alors 8 ml de milieu de survie et 0,5 ml du virus dilué au 1/10.

Le milieu de survie est ainsi composé:

Tryptose phosphate broth	200 g
Sérum de singe inactivé 30' à 56° C.	25 ml
Glucose	4 g
Milieu 199 en solution saline de Earle qsp	1 l.

d)- Récolte :

Après 72 heures d'incubation à 36° C, la dégénérescence est pratiquement totale. On rajuste alors le pH à 7,2 - 7,4 avec une solution de bicarbonate de sodium à 8,8 %. Après remise en suspension des cellules dégénérées, le liquide est recueilli et stocké à - 20° C.

Avant l'emploi en fixation du complément, les antigènes sont décongelés et centrifugés à 1 000 tours/minute pendant 15 minutes pour ôter les cellules. C'est le surnageant qui constitue l'antigène.

2°/- Applications :

Nous n'avons pas utilisé de façon courante la technique proposée par SCHMIDT.

En effet, la prolongation du temps de croissance des cellules donnait des cultures trop riches qui n'étaient plus "monocellulaires". Par ailleurs, le pouvoir anticomplémentaire étant en relation avec le matériel cellulaire fourni, il nous a semblé que des cultures trop riches donneraient plus volontiers des liquides anticomplémentaires.

Deux antigènes ont été préparés selon la technique proposée par SCHMIDT. Les cellules âgées de huit jours étaient recouvertes par 0,1 ml ($10^{7.7}$ DICT 50 environ) de suspension virale non diluée et maintenue en survie dans le liquide suivant :

Tryptose phosphate broth Difco	6 g/l
Glucose	405 mg/l
Sérum de singe inactivé 30' à 56° C.	25 ml/l

dans du liquide amniotique de bovidés additionné d'antibiotiques.

Après incubation de deux jours à 36° C, les cellules étaient entièrement dégénérées et la chute évaluée à 80-90 %. Le liquide était alors recueilli selon la technique de SCHMIDT citée plus haut. Un seul antigène avait son pH ajusté à 7,4. L'autre était utilisé tel quel avec un pH final de 6.

Tous deux étaient peu actifs en fixation du complément et très anticomplémentaires.

3°/- Modifications :

66 antigènes ont été préparés :

- 4 sur cellules amniotiques humaines nous ont donné 4 antigènes anticomplémentaires.
- 4 sur cellules de rein de singe qui ont donné 1 antigène utilisable et 3 antigènes faibles (*)
- 58 sur cellules Hela parmi lesquels 8 antigènes utilisables et 25 antigènes anticomplémentaires.

Nous n'envisagerons que les essais conduits sur cellules Hela.

a)- Les souches :

Les souches utilisées sont les suivantes :

- Type 1 : souche Brunhilde
- Type 2 : souches MEFI et Statler
- Type 3 : souche Saukett.

b)- L'inoculat :

La suspension virale est inoculée non diluée sous un volume de 0,4 à 1 ml, soit de 126 à 416 millions de DICT 50 par flacon de 50 ml ou 1 litre.

(*) - Voir page 21

c)- Les cellules :
.....

Les cellules étaient cultivées dans un milieu de survie à base de sérum de veau ou de poulain, ainsi qu'il est décrit page 13 .

Les milieux de survie étaient variables dans leur composition mais de volume fixe : 20 ml pour les flacons de Kolle et 50 ml pour les fioles de Roux de un litre. Nous désignerons désormais ces milieux par des lettres majuscules (tableau 5). Tous sont additionnés d'antibiotiques.

d)- La récolte :
.....

Lorsque les cellules étaient totalement dégénérées, après 24 heures le plus souvent, le liquide était recueilli et conservé congelé à - 20° C. Avant l'utilisation en fixation du complément, il était décongelé et soumis à une centrifugation douce 2 000 tours/minute pendant dix minutes.

Nous allons envisager successivement les différents facteurs étudiés :

- influence des souches,
- influence du temps de contact virus-cellules,
- influence de la présence de sérums animaux dans le milieu de survie,
- addition de sérum de cobaye pour ôter le pouvoir anticomplémentaire,
- étude des milieux de survie.

1 - Influence des souches :

Sur 58 antigènes préparés sur cellules Hela, nous avons utilisé :

Type 1 souche Brunhilde	: 47 antigènes
Type 2 souche MEFI	: 2 antigènes
Type 2 souche Statler	: 5 antigènes
Type 3 souche Saukett	: 4 antigènes.

TABLEAU 5

Milieux de survie

Dési- gnation	Milieu de base	Additionné de :
A	Liquide amniotique de bovidés	Tryptose phosphate broth 6 g/l Glucose 0,9 g/l
B	Liquide amniotique de bovidés	Tryptose phosphate broth 6 g/l Glucose 0,45 g/l Sérum de veau inactivé . 50 ml/l
C	Liquide amniotique de bovidés	Tryptose phosphate broth 6 g/l Glucose 0,45 g/l Sérum de singe inactivé 25 ml/l
D	Solution saline équilibrée de EARLE ou de HANKS	Hydrolysate de lactalbumine 5 g/l Glucose 0,45 g/l Tryptose phosphate broth 6 g/l
E	Milieu D	Sérum de veau inactivé . 50 p. mille
F	Milieu D	Sérum de singe inactivé 25 p. mille
G	Milieu D	Liquide amniotique de bovidés 200 p. mille
H	Milieu 199 de PARKER	Tryptose phosphate broth 6 g/l Glucose 0,45 g/l Sérum de singe inactivé. 25 p. mille
I	Solution saline équilibrée de EARLE	Hydrolysate de lactalbumine 5 g/l Sérum de veau 25 p. mille

Les tableaux 6 et 7 donnent les résultats obtenus dans des conditions identiques avec quatre milieux de survie différents.

Que l'on considère le rendement en antigènes utilisables (*) dans la réaction de fixation du complément ou bien la présence de pouvoir anticomplémentaire, aucune conclusion n'est possible.

2- Influence du temps de contact virus-cellules

Sachant qu'un délai de quinze minutes est suffisant pour assurer la pénétration du virus poliomyélitique dans les cellules Hela (FOGH 1955 - 34), il a été envisagé de laisser le virus en contact avec les cellules trente à cinquante minutes. Les flacons étaient ensuite vidés et les cellules recouvertes par une nouvelle quantité de milieu frais.

Les tableaux 8 et 9 montrent qu'il n'y a pas de modification notable de la qualité des antigènes obtenus.

Cette méthode n'a donc pas été retenue dans la pratique courante.

3 - Influence de la présence de sérums animaux dans le milieu de survie :

Nous avons utilisé des sérums animaux inactivés par chauffage trente minutes à 56° C. Ils étaient ajoutés aux milieux de survie dans les proportions suivantes :

- 5 % pour le sérum de veau,
- 2,5 % pour le sérum de singe.

Sur 58 antigènes préparés sur cellules Hela, 22 ne contenaient pas de sérum animal dans leur milieu de survie, 36 en contenaient dont 17 du sérum de veau et 19 du sérum de singe. Le tableau 10 montre qu'en présence de sérum animal, qu'il s'agisse de sérum de veau ou de sérum de singe, le rendement est nul et le pouvoir anticomplémentaire beaucoup plus important qu'en l'absence de sérum animal dans le milieu de survie. Le sérum de singe paraît aussi nuisible que le sérum de veau, contrairement à l'observation de SCHMIDT et Coll. (1957 - 97) qui préconisent l'addition de 2,5 % de sérum de

(*) voir page 21

TABLEAU 6

Rendement en antigènes fixant le complément
utilisables (°) selon les souches et le milieu de survie

Milieu de survie	SOUCHES UTILISEES			
	Brunhilde t 1	MEF ₁ t 1	Statler t 2	Saukett t 3
A	3/5 (1)	1/1	1/2	NF (2)
E	0/8	NF	0/2	NF
C	0/5	NF	0/1	NF
D	NF	0/1	NF	0/4
Total	3/18	1/2	1/5	0/4
(°) Voir définition p. 21 (1) Numérateur : nombre d'antigènes utilisables Dénominateur : nombre d'antigènes préparés (2) NF : non fait				

TABLEAU 7

Etude de la présence du pouvoir anticomplémentaire
selon les souches et selon le milieu de survie

Milieu de survie	SOUCHES UTILISEES			
	Brunhilde t 1	MEF1 t 2	Statler t 2	Saukett t 3
A	0/5 (1)	0/1	1/2	NF (2)
E	7/8	NF	2/2	NF
C	4/5	NF	1/1	NF
D	NF	0/1	NF	0/4
Total	11/18	0/2	4/5	0/4
(1) Numérateur : nombre d'antigènes anticomplémentaires Dénominateur : nombre d'antigènes préparés (2) NF : non fait				

TABLÉAU 8

Etude du rendement en antigènes utilisables (°)
selon différents milieux de survie
avec ou sans contact limité du virus

Milieu de survie	Contact prolongé du virus	Contact limité du virus
A	3/8 (1)	2/2
E	0/8	0/2
D	0/1	0/4
TOTAL	3/17	2/8
(°) Voir définition p. 21		
(1) Numérateur : nombre d'antigènes utilisables Dénominateur : nombre d'antigènes préparés		

TABLÉAU 9

Etude du pouvoir anticomplémentaire selon différents milieux de survie
avec ou sans contact limité du virus

Milieu de survie	Contact prolongé du virus	Contact limité du virus
A	1/8 (1)	0/2
E	7/8	2/2
D	0/1	0/4
Total	8/17	2/8
(1) Numérateur : nombre d'antigènes anticomplémentaires Dénominateur : nombre d'antigènes préparés		

TABLEAU 10

Influence des sérums animaux dans le milieu de survie

		Nombre d'antigènes préparés	Nombre d'antigènes utilisables (1)	Nombre d'antigènes anti- complémen- taires
Sans sérum animal		22	8	1
Avec sérum animal	veau 5 %	17	0	12
	singe 2,5 %	19	0	12
	Total	36	0	24
(1) Voir p. 21				

singe dans le milieu de survie.

4 - Addition de sérum de cobaye pour ôter le pouvoir anticomplémentaire :

VON ZEIPEL (1953 - 132) ayant montré l'action favorable du sérum de cobaye pour ôter ou diminuer le pouvoir anticomplémentaire, nous avons essayé de le rajouter à raison de 5 % :

- soit dans le milieu de survie au moment de l'inoculation des cellules,

- soit au moment de la récolte de l'antigène avant sa congélation.

* Addition du sérum de cobaye dans le milieu de survie

Dans des conditions strictement identiques de cellules, de souche, de milieu, de contact, nous avons étudié 8 antigènes. A 4 d'entre eux 5 % de sérum de cobaye étaient rajoutés dans le milieu de survie. Le tableau 11 montre que cette addition n'augmente pas le rendement en antigène valable, bien qu'il semble y avoir une diminution du pouvoir anticomplémentaire.

* Addition du sérum de cobaye au moment de la récolte

Quatorze antigènes ont été préparés additionnés de 5 % de sérum de cobaye au moment de la récolte parallèlement à 29 antigènes recueillis directement. Les tableaux 12 et 13 montrent que l'addition de sérum de cobaye ne modifie pratiquement pas le rendement tout en diminuant très légèrement le pouvoir anticomplémentaire.

Qu'il soit ajouté au moment de l'inoculation des cellules ou à la récolte de l'antigène, le sérum de cobaye présente donc la même action. Cette méthode n'a pas été adoptée de façon systématique.

5 - Etude des milieux de survie

- Comparaison des milieux de base :

. liquide amniotique de bovidés,

TABLÉAU 11

Action du sérum de cobaye ajouté au milieu de survie

	Nombre d'antigènes préparés	Nombre d'antigènes utilisables (1)	Nombre d'antigènes antico-plémen- taires
Sans sérum	4	0	2
Avec sérum	4	0	1
(1) Voir définition p. 21			

TABLIU 12

Etude de l'action du sérum de cobaye ajouté au moment de la récolte
pour l'obtention d'antigènes utilisables (°)
en fixation du complément,
selon les milieux de survie

Milieu de survie	Sans sérum de cobaye	5 % de sérum de cobaye additionnés au moment de la récolte
A	5/8 (1)	3/3
E	0/10	0/3
C	0/6	0/3
H	0/3	0/3
G	0/2	0/2
Total	5/29	3/14

(°) Voir définition p. 21

(1) Numérateur: nombre d'antigènes utilisables
Dénominateur : nombre d'antigènes préparés

TABIEAU 13

Action du sérum de cobaye ajouté à la récolte de l'antigène
sur le pouvoir anticomplémentaire
selon différents milieux de survie

Milieu de survie	Sans sérum de cobaye	5 % de sérum de cobaye additionnés au moment de la récolte
A	1/8 (1)	0/3
E	9/10	2/3
C	5/6	2/3
H	1/3	1/3
G	0/2	0/2
Total	16/29	5/14
(1) Numérateur : nombre d'antigènes anticomplémentaires Dénominateur : nombre d'antigènes préparés		

- hydrolysate de lactalbumine en solution saline équilibrée
- milieu 199.

Ces trois milieux de base ont été utilisés, dans des conditions par ailleurs identiques, additionnés chacun de glucose (0,45 g/l), de tryptose phosphate broth (6 g/l) et de sérum de singe inactivé (2,5 %).

Nos résultats sont résumés dans le tableau 14 . Le rendement en antigènes utilisables (*) est nul. Ceci est en relation avec la présence de sérum de singe, ainsi que nous l'avons démontré plus haut (tableau 10) Si on considère le pouvoir anticomplémentaire, il semble que le milieu 199 donne le moins d'antigènes anticomplémentaires.

- Milieu à base de liquide amniotique de bovidés.

Si on reprend les tableaux 6 et 7 , 8 et 9 , 12 et 13 , il apparaît que le milieu le plus favorable est le milieu A (liquide amniotique, tryptose phosphate broth, glucose) (voir tableau 5). En effet, sur 58 antigènes préparés sur cellules Hela, 8 seulement sont utilisables. Ces 8 antigènes ont été préparés avec le milieu A.

L'expérience suivante a été conduite afin d'étudier l'action propre du liquide amniotique. Dans des conditions strictement identiques, on a utilisé soit le milieu de survie D à base d'hydrolysate de lactalbumine, de tryptose phosphate broth et de glucose, soit le même milieu additionné de 20 % de liquide amniotique. Les résultats sont résumés dans le tableau 15 .

6 - Conclusions

Sur 58 antigènes préparés sur cellules Hela, 8 antigènes seulement ont été observés utilisables (*) en fixation du complément, dont :

- 6 avec la souche Brunhilde (type 1),
- 1 avec la souche MEFT (type 2),
- 1 avec la souche Statler (type 2),

Les antigènes préparés en type 2 l'ont été avec contact de cinquante minutes du virus puis changement du milieu de survie.

TABLÉAU 14.

Comparaison des milieux de survie à base de liquide amniotique
de bovidés, de milieu 199 et d'hydrolysate de lactalbumine
en solution équilibrée

	Liquide amniotique de bovidés	Milieu 199	Hydrolysate de lactalbumine
Nombre d'antigènes utilisables (1) / nombre d'antigènes préparés	0/9	0/6	0/4
Nombre d'antigènes anticoimplémentaires / nombre d'antigènes préparés	7/9	2/6	3/4
(1) Voir p. 21			

TABLERAU 15

Action du liquide amniotique dans le milieu de survie

Milieu de survie (1)	Nombre d'antigènes préparés	Nombre d'antigènes utilisables (2) obtenus	Nombre d'antigènes anticoimplémen- taires
D	5	0	0
G (D + liquide amniotique)	4	0	0
(1) Voir tableau 5 (2) Voir p. 21			

3 sur 6 antigènes utilisables en type 1 ont été additionnés de sérum de cobaye au moment de la récolte.

Tous ont été préparés avec le même milieu de survie A : liquide amniotique de bovidés additionné de tryptose phosphate broth 6 g/l et de glucose 0,9 g/l.

Avec ce même milieu nous avons également préparé :

2 antigènes en type 1 (souche Brunhilde) faiblement actifs en fixation du complément,

1 antigène en type 2 (souche Statler) anticomplémentaire.

Le rendement de ce milieu de survie n'est donc pas absolu mais de loin supérieur aux autres milieux. Sans doute sa richesse en glucose (EAGLE 1955 - 25), la présence de tryptose phosphate broth (GINSBERG et Coll. 1955 - 42) et de liquide amniotique de bovidés (ENDERS 1955 - 30), enfin l'absence de sérum animal sont un ensemble de conditions favorables. Nous regrettons que l'étude comparative du milieu 199 n'ait pu être faite.

Nous avons clairement démontré l'action défavorable des sérums animaux dans le milieu de survie. Ceux-ci entraînent presque constamment l'apparition de pouvoir anticomplémentaire.

Temps de contact limité du virus avec les cellules et addition de sérum de cobaye ne nous ont pas semblé d'un grand intérêt pratique.

Nous retiendrons donc de cette étude deux points essentiels pour la préparation des antigènes poliomyélitiques en vue de la réaction de fixation du complément :

1°/- On doit éviter la présence de sérum animal dans un milieu de survie autre que le milieu 199, milieu peu riche qui fournit à SCHMIDT et Coll. (1956 - 96 , 1957 - 97) de bons antigènes pour fixation du complément.

2°/- Le milieu A (liquide amniotique de bovidés additionné de tryptose phosphate broth 6 g/l et de glucose 0,9 g/l) nous est apparu particulièrement intéressant.

B - ANTIGENES CONCENTRES - Technique avec libération de l'antigène cellulaire.

Selon une suggestion de SVEN GARD, ARTZET (1960 - 3, 1960 - 4) on obtient de bons antigènes fixant le complément en libérant par congélations et décongélations successives du culot cellulaire l'antigène formé dans les cellules avant sa libération dans le milieu. Cette technique, facile à mettre en oeuvre, fournit des antigènes dont le titre est parfois élevé ($1/4$ à $1/10$) et dont le pouvoir anticomplémentaire est en général faible. Cette méthode est actuellement utilisée au Laboratoire d'Hygiène.

I - Technique originale de ARTZET

a)- Les souches :
.....

ARTZET utilise les souches sauvages suivantes : type 1 : souche Nahoney; type 2 : souche MEET; type 3 : souche Saukett.

b)- L'inoculat :
.....

Le virus est inoculé sous un volume voisin de 10 ml à 15 ml d'une suspension virale diluée au $1/10$ de façon à introduire environ 4 à 5 particules virales par cellule.

c)- Les cellules :
.....

Les cellules sont des cellules KBensemencées en flacons de Roux à raison de 10 millions de cellules pour les boîtes de un litre et de 50 millions de cellules pour les boîtes de 3,5 litres sous un volume respectivement de 100 et 500 ml.

Le milieu de croissance est le milieu 18 de l'Institut Pasteur à base d'hydrolysate de caséine et contenant 15 % de sérum de veau. Le milieu est changé une fois. Après 4 à 5 jours, le tapis de cellules est continu et correspond approximativement à :

$2-3 \times 10^7$ cellules pour les boîtes de un litre
 $10-15 \times 10^7$ cellules pour les boîtes de 3, 5 litres.

Le milieu de croissance est alors remplacé par 100 ml du même milieu mais contenant seulement 2,5 % de sérum de veau, et les cellules sont inoculées avec le virus.

d)- La récolte :
.....

Après 21 à 24 heures d'incubation à 36° C, les cellules "fortement lésées se détachent spontanément du verre et il suffit d'une agitation de la bouteille pour entraîner la nappe cellulaire en son entier.

Le contenu de la bouteille est alors centrifugé à faible vitesse, de manière à séparer milieu et culot cellulaire.

Le surnageant S prélevé est conservé pour contrôle par fixation du complément et les cellules remises en suspension dans un volume de tampon au véronal correspondant à la concentration souhaitée, par exemple 5 ml pour une boîte de Roux de 1 litre, soit une concentration de 20 fois, exprimée par le rapport entre le volume de tampon au véronal et le volume initial de milieu. Après homogénéisation par pipettage, cette suspension est congelée en couche mince à - 40°, - 50° C (mélange alcool - neige carbonique par exemple) puis décongelée au bain-marie à +30° -35° C. L'opération est répétée cinq fois et le résultat centrifugé à faible vitesse quelques minutes, de manière à précipiter les débris cellulaires. Le surnageant de cette dernière centrifugation est l'antigène C du culot cellulaire".

II - Modifications étudiées au Laboratoire d'Hygiène

a)- Les souches :
.....

Les souches utilisées étaient :

Type 1 : souches sauvages Brunhilde et Mahoney,
souche atténuée de Sabin,

Type 2 : souches sauvages MEET et Statler,
Souche atténuée de Sabin,

Type 3 : Souches sauvages Saukett, Mac Mullen et Léon,
souche atténuée de Sabin,

b)- L'inoculat :
.....

L'inoculat était variable, la suspension virale étant utilisée non diluée (0,9 - 1 ml) ou diluée au maximum au 1/10 (10 ou 15 ml) pour chaque

flacon de Roux de un litre, soit de $8,5 \text{ à } 2\,139 \times 10^6$ DICT 50.

c)- Les cellules :
.....

Les cellules utilisées étaient des cellules KB, de rein de singe, Hela ou HEp2 obtenues ainsi qu'il est décrit plus haut (voir chapitre I : Matériel pour l'obtention des antigènes).

Lorsque les cellules se présentaient en une nappe confluyente, elles étaient lavées par trois fois 100 ml de solution de PBS (DULBECCO et Coll. 1954 - 22).

Les milieux de survie utilisés sont décrit dans le tableau 5 . Après inoculation, les cellules étaient remises en position stationnaire à 36°C pendant un temps variable.

d)- La récolte :
.....

La récolte de l'antigène est faite lorsque 90 % des cellules sont dégénérées. Celles-ci se détachent alors du verre par agitation douce. Après centrifugation à 2 000 tours/minute pendant dix minutes, le culot cellulaire est repris par de la solution de PBS de façon à concentrer vingt fois (5 ml pour une boîte de Roux de un litre contenant 100 ml de milieu de survie). La suspension cellulaire obtenue est soumise à 5 congélations successives (-40°C + 57°C) puis centrifugée à 2 000 tours/minute pendant dix minutes afin d'ôter les débris cellulaires. Le surnageant obtenu constitue l'antigène. Il est conservé congelé à -20°C .

Nous allons envisager successivement les résultats obtenus selon différentes cellules utilisées en indiquant pour chacune les facteurs variables : souche utilisée, inoculat, milieu de survie.

1°/- Antigènes préparés sur cellules KB

Il a été préparé un seul antigène sur cellules KB avec le virus de type 1 (souche sauvage Brunhilde) selon la technique de Artzet avec pour seule modification l'utilisation d'un milieu de croissance à base d'hydrolysate de lactalbumine et de 10 % de sérum de poulain (voir page 13). Le milieu de

survie était le milieu D (tableau 5) souvent adopté au laboratoire.

L'antigène obtenu était excellent, les sérums retrouvant leur titre pour une dilution au 1/8 de l'antigène.

Cependant nous avons substitué à la lignée continue KB les lignées continues Hela et HEp2.

2°/- Antigènes préparés sur cellules de rein de singe

Les cellules de rein de singe étaient obtenues ainsi qu'il est décrit au chapitre I (Matériel pour l'obtention des antigènes), page 12.

Lorsque la culture cellulaire était satisfaisante, les cellules étaient alors lavées par trois contacts successifs avec 100 ml de solution de PBS puis recouvertes par 50 ml du milieu de survie D (voir tableau 5) et inoculées par le virus.

Les souches étaient pour les trois types les souches atténuées de Sabin. Elles étaient ensemencées à raison de 0,9 ml de suspension virale non diluée ou de 15 ml de suspension virale diluée au 1/5; soit de $8,5 \text{ à } 436 \times 10^6$ DICT 50 par boîte de Roux de un litre.

Lorsque la dégénérescence cellulaire était pratiquement totale, soit 48 à 72 heures après l'inoculation, on recueillait l'antigène.

4 antigènes ont été ainsi préparés. Aucun était anticomplémentaire, mais tous étaient pratiquement inactifs en fixation du complément.

3°/- Antigènes préparés sur cellules Hela

65 antigènes ont été préparés sur cellules Hela à partir du culot cellulaire :

19 antigènes en type 1, soit 17 avec les souches sauvages

Brunhilde (13 antigènes)

Mahoney (4 antigènes)

2 avec la souche atténuée de Sabin

13 antigènes en type 2, soit 12 avec les souches sauvages

MEFI (6 antigènes)

Statler (6 antigènes)

1 avec la souche atténuée de Sabin

33 antigènes en type 3, soit 27 avec les souches sauvages

Saukett (20 antigènes)

Mac Mullen (5 antigènes)

Léon (2 antigènes)

6 avec la souche atténuée de Sabin.

Le virus est inoculé à raison de 15 ml de suspension virale diluée au 1/5 ou au 1/10 le plus souvent ou 1 ml de suspension virale non diluée, soit de 16 à $2\ 139 \times 10^6$ DICT 50 par boîte de Roux de un litre, ce qui correspond approximativement à 2,2 - 76 DICT 50 par cellule.

Les cellules sont cultivées en sérum de veau ou de poulain ainsi qu'il est décrit au chapitre I (page 13).

Après trois jours, elles se présentent en nappe confluyente "monocellulaire" qu'on lave par contact trois fois trente minutes avec 100 ml de solution de PBS. Elles sont alors inoculées après avoir remplacé le milieu de croissance par 50,85 ou 100 ml d'un milieu de survie variable (D le plus souvent voir tableau 5). On replace alors les boîtes en position stationnaire à 36° C. Lorsque la dégénérescence est pratiquement totale, soit environ 21 heures après l'inoculation on récolte l'antigène selon la technique citée plus haut (voir page 50).

Sur les 65 antigènes ainsi préparés, on a obtenu :

33 antigènes utilisables (*)

5 antigènes anticomplémentaires.

1 - Influence de la souche de virus

41 antigènes ont été préparés dans le milieu de survie D et selon les conditions techniques décrites précédemment.

(*) - Voir page 21

Le tableau 16 indique pour chaque souche utilisée :

- le nombre d'antigènes préparés,
- R est le nombre d'antigènes utilisables obtenus (voir page 21)
- PAC est le nombre d'antigènes obtenus ayant un pouvoir anti-complémentaires. L'examen du tableau 16 montre que dans des conditions par ailleurs identiques de cellules, d'inoculat, de milieu de survie (milieu de survie D), les résultats obtenus sont excellents pour le type 1 dans lequel on n'observe pas de pouvoir anticomplémentaire avec un rendement voisin de 100 %. Avec les types 2 et 3 le rendement est moins bon, au voisinage de 50 %.

Bien que les résultats aient été particulièrement mauvais avec la souche Mac Mullen et particulièrement bons avec la souche Léon, on ne peut conclure à une différence d'activité des souches qui sont en général d'activité équivalente pour un même type.

De même souches sauvages ou souches atténuées peuvent être employées indifféremment, ce qui nous permet d'utiliser préférentiellement les souches Sabin par égard pour le manipulateur.

2 - Influence de l'inoculat

a)- Volume total utilisé

La quantité de milieu de survie optima à utiliser a été recherchée.

Dans deux expériences analogues pratiquées l'une avec la souche Brunhilde (type 1), l'autre avec la souche Saukett (type 3), 22 DICT 50 par cellule, soit un total de 617×10^6 DICT 50 contenus dans 15 ml de milieu ont été inoculées. L'inoculat était ajouté sur les cellules après 50 ou 100 ml de milieu de survie.

Le tableau 17 montre que 50 ml de milieu de survie sont préférables, 100 ml donnant trois fois sur quatre un antigène peu actif en fixation du complément.

TABLEAU 16

Antigènes cellulaires préparés sur cellules HeLa
Influence de la souche virale

	TYPE 1			TYPE 2			TYPE 3			
	Sauvage		Atténuée	Sauvage		Atténuée	Sauvage			Atténuée
	Brunhilde	Mahoney	Sabin	MEF ₁	Statler	Sabin	Saukett	MacMullen	Leon	Sabin
Nombre d'antigènes préparés	8	4	2	1	1	1	II	5	2	6
R (1)	7	4	2	1	0	0	6	0	2	3
PAC (2)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Souches sauvages ou atténuées	II/12 (3)		2/2	I/2		0/I	8/18			3/6
TOTAL par type	I3/I4			I/3			II/24			

(1) R : rendement en antigènes utilisables, soit :

$$\frac{\text{nombre d'antigènes utilisables}}{\text{nombre d'antigènes préparés}}$$

(2) PAC : pouvoir anticomplémentaire, soit :

$$\frac{\text{nombre d'antigènes anticomplémentaires}}{\text{nombre d'antigènes préparés}}$$

(3) Numérateur : nombre d'antigènes utilisables
 Dénominateur : nombre d'antigènes préparés

TABLÉAU 17

Influence de la quantité de milieu de survie

Volume de milieu de survie	Souche Brunhilde		Souche Saukett	
	50 ml	100 ml	50 ml	100 ml
Nombre d'antigènes préparés	2	2	2	2
Nombre d'antigènes utilisables (1)	2	1	2	0
(1) Voir p.				

b)- Dose inoculée
.....

Le tableau 18 représente les résultats obtenus dans des conditions techniques identiques, en particulier avec 50 ml de milieu de survie D, le virus étant inoculé dilué au 1/10 sous un volume de 15 ml. Seule la dose inoculée varie. L'examen de ce tableau montre qu'il n'y a pas d'influence directe de la dose inoculée sur le rendement en antigènes fixant le complément. Il semble cependant qu'il y ait une certaine quantité de virus à respecter, que trop ou trop peu de virus sont nuisibles, la dose optima allant de 100 à 1 200 $\times 10^6$ DICT 50, ce qui correspond à l'inoculation de 5 à 50 particules infectieuses (DICT 50) par cellule.

3 - Influence du milieu de survie

a)- action du sérum de veau
.....

Nous avons comparé trois milieux de survie : les milieux D, E, I décrits au tableau 5 .

Le tableau 19 montre que l'addition de sérum de veau dans le milieu de survie entraîne souvent l'apparition de pouvoir anticomplémentaire et diminue le rendement en antigène utilisable (voir définition page 21). Ceci est en accord avec nos résultats sur les antigènes préparés d'après la technique de SCHMIDT (voir plus haut).

Cependant si nous considérons (tableau 20) les antigènes préparés avec 50 ml des milieux D, E, I de survie en type 1 (souche Brunhilde), le milieu I apparaît utilisable, bien qu'il contienne du sérum de veau. Il s'agit d'un milieu relativement moins riche que le milieu D qui, lui, est enrichi en glucose et en tryptose phosphate broth. Il semble donc que le sérum animal soit alors mieux supporté pour la production d'antigène.

Toutefois, le tableau 19 montre que pour les types 2 et 3 il n'en va pas de même et nous persistons à éviter la présence de sérum animal dans le milieu de survie.

b)- action de la glutamine
.....

A la suite des travaux de EAGLE (1955 - 25) nous avons

TABLEAU 11.

Rendement en antigènes utilisables
en fonction de la dose de virus inoculée sur cellules HeLa

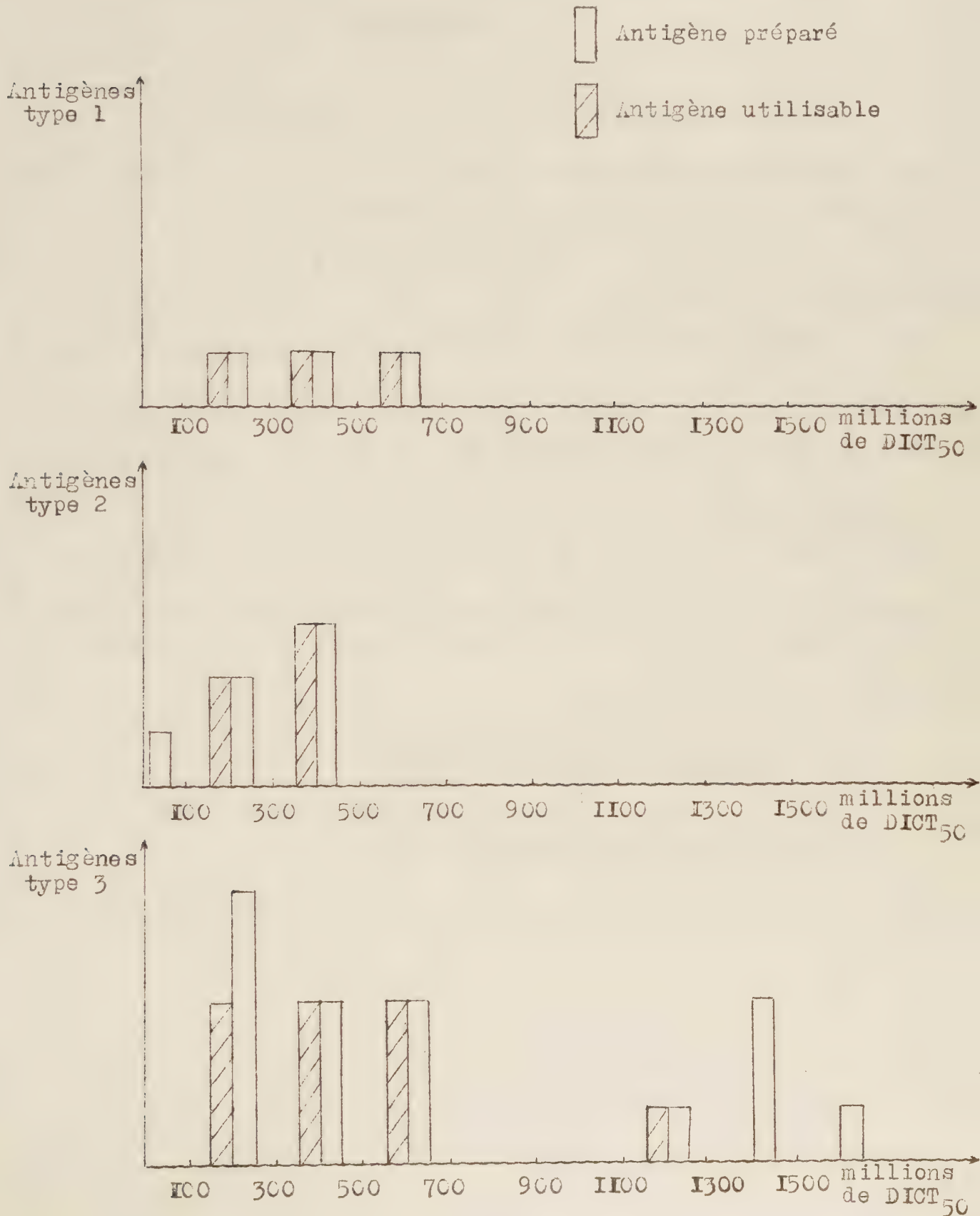


TABLEAU 19

Influence du sérum de veau dans le milieu de survie

	Milieu D		Milieu E		Milieu F	
	R (1)	PAC (2)	R	PAC	R	PAC
TYPE 1 Souche Brunhilde	7/8	0/8	0/2	I/2	2/2	0/2
TYPE 2 Souche Statler	0/I	0/I	NF (3)	NF	0/2	2/2
TYPE 3 Souche Saukett	6/II	0/II	NF	NF	0/4	I/4
TOTAL	I3/20	0/20	0/2	I/2	2/8	3/8

(1) R : Rendement en antigènes utilisables, soit :

$$\frac{\text{nombre d'antigènes utilisables}}{\text{nombre d'antigènes préparés}}$$

(2) PAC : Pouvoir anticomplémentaire, soit :
$$\frac{\text{nombre d'antigènes anticomplémentaires}}{\text{nombre d'antigènes préparés}}$$

(3) NF : Non fait

TABLEAU 20

Action du sérum de veau dans le milieu de survie
pour les antigènes de type 1 souche Brunhilde

milieu de survie (1)	Nombre d'antigènes préparés	Nombre d'antigènes utilisables	Nombre d'antigènes anticoimplé- mentaires	Rendement
D	5	5	0	5/5
E	2	0	1	0/2
I	2	2	0	2/2
(1) Voir tableau 5				

ajouté 1 p. mille de glutamine au milieu D de survie : nous n'avons pas observé alors de modification dans le rendement en antigène fixant le complément. L'addition de glutamine n'a donc pas été adoptée de façon systématique.

c)- action du glucose
.....

EAGLE (1955 - 25) ayant également insisté sur l'importance du glucose, importance que nous avons confirmé lors de travaux sur les antigènes de SCHMIDT (voir page 47), nous avons essayé d'enrichir notre milieu de survie D en doublant la quantité de glucose (de 450 à 900 mg/l). Cette addition s'est montrée sans action sur les antigènes obtenus et a été abandonnée.

d)- autres milieux de survie étudiés
.....

Les études sur les antigènes de SCHMIDT ayant montré la valeur du liquide amniotique de bovidés comme base de milieu de survie, on a cherché à le substituer à l'hydrolysât de lactalbumine utilisé dans le milieu D.

Dans des conditions par ailleurs identiques, trois milieux de survie de base (tableau 21) ont ainsi été comparés :

- I : hydrolysât de lactalbumine (5 g/l) en solution équilibrée de Hanks,
- II : ~~solution équilibrée de Hanks,~~
- III : liquide amniotique de bovidés.

Ces trois milieux de base étaient enrichis par du tryptose phosphate broth (6 g/l) et par du glucose (450 mg/l).

Bien qu'un seul antigène ait été préparé avec du liquide amniotique, nous avons considéré que notre milieu classique à base d'hydrolysât de lactalbumine restait le plus satisfaisant (tableau 21).

4 - Conclusions

65 antigènes ont été préparés sur cellules Hela par la technique avec libération de l'antigène cellulaire:

19 en type 1, parmi lesquels 16 utilisables et 1 anticomplémentaire,

TABLEAU 21

Etude de trois milieux de survie

	I	II	III
TYPE 2 Souche MEF ₁ Souche Statler	I/I (1) 0/I	2/4 2/3	NF (2) NF
TYPE 3 Souche Saukett	7/12	0/3	0/I
TOTAL	8/14	4/10	0/I
(1) Numérateur : nombre d'antigènes utilisables (voir p. 21) Dénominateur : nombre d'antigènes préparés (2) NF : non fait			

13 en type 2, parmi lesquels 5 utilisables et 2 anticomplémentaires,

33 en type 3, parmi lesquels 12 utilisables et 2 anticomplémentaires. (*)

33 antigènes utilisables ont été ainsi obtenus, soit un rendement de 51 %.

5 antigènes étaient anticomplémentaires : 4 contenaient du sérum de veau dans le milieu de survie; le cinquième était préparé avec le milieu de survie D (hydrolysate de lactalbumine enrichi en glucose et tryptose phosphate broth) et la souche Mac Mullen (type 3). Il faut noter que deux antigènes utilisables ont été obtenus en présence du milieu I (hydrolysate de lactalbumine) contenant 2,5 % de sérum de veau.

L'addition de glutamine ou la concentration en glucose du milieu de survie n'ont pas semblé intéressantes, d'après les quelques essais effectués, pas plus que l'utilisation de liquide amniotique de bovidés.

Le milieu de survie retenu rest donc le milieu D à base d'hydrolysate de lactalbumine et enrichi en glucose et tryptose phosphate broth.

La quantité d'inoculat à utiliser a été envisagée; les souches Sabin ont paru aussi intéressantes que les souches sauvages. Remarquons que sur 4 antigènes préparés avec la souche Mac Mullen, aucun était utilisable car d'activité trop faible en fixation du complément. Il apparaît clairement que les souches de type 1 donnent plus régulièrement de bons antigènes.

4°/- Antigènes préparés sur cellules HEp2

38 antigènes ont été préparés sur cellules HEp2 soit :

Type 1 : 11 antigènes dont 2 avec la souche sauvage Brunhilde,
9 avec la souche atténuée de Sabin,

Type 2 : 9 antigènes dont 2 avec les souches sauvages Statler (1 antigène)
MEET (1 antigène)

7 avec la souche atténuée de Sabin,

Type 3 : 18 antigènes dont 2 avec les souches sauvages Saukett (1 antigène)
Mac Mullen (1 antigène)

16 avec la souche atténuée de Sabin.

Le virus est inoculé sous un volume de 10 à 15 ml de suspension virale diluée du 1/5 au 1/10 ; soit de $9 \text{ à } 2 \cdot 138 \times 10^{-6}$ DICT 50, ce qui correspond à l'inoculation de 5 à 40 particules infectieuses (DICT 50) par cellule.

Les cellules sont obtenues ainsi qu'il est décrit au chapitre I (page 14). Après lavage trois fois par 100 ml de solution de PBS (DULBECCO et Coll. 1954 - 22), les cellules sont recouvertes par 50 ml de milieu de survie D (voir tableau 5). Elles sont inoculées par la suspension virale diluée dans ce même milieu de survie. Après 24 heures à 36° C, elles sont totalement dégénérées et l'antigène est recueilli selon la technique décrite plus haut (page 50).

Ces antigènes préparés sur cellules HEp2 sont donc obtenus selon des conditions identiques de milieu de survie et de technique. Seuls la dose inoculée, le nombre de cellules et le type de virus utilisé sont variables. C'est l'influence de ces facteurs que nous allons étudier.

a)- Influence de la souche de virus

Le tableau 22 étudie pour chaque souche virale utilisée le nombre d'antigènes préparés, le nombre d'antigènes utilisables (*) obtenus et le nombre d'antigènes anticomplémentaires (*). Ce tableau montre que le rendement pour les trois types est sensiblement identique, contrairement à celui observé sur cellules Hela.

Aucun pouvoir anticomplémentaire n'a été observé sur les 38 antigènes préparés.

Les souches atténuées de Sabin donnent des résultats légèrement inférieurs aux souches sauvages pour les types 1 et 2, mais pour le type 3 on observe une discordance marquée: la souche de Sabin donne des résultats nettement supérieurs aux souches sauvages de Saukett et Mac Mullen. Le nombre d'an-

(*) - Voir page 21

TABLEAU 22

Influence de la souche virale sur les antigènes
préparés sur cellules Hep2

	TYPE 1		TYPE 2			TYPE 3		
	Sau- vages	Atté- nuées	Sauvages		Atté- nuées	Sauvages		Atté- nuées
	Brun- hilde	Sabin	Statler	MEF 1	Sabin	Saukett	Mac Mullen	Sabin
Nombre d'antigènes préparés	2	9	1	1	9	1	1	16
Nombre d'antigènes utilisables	2	6	1	1	5	0	0	12
Nombre d'antigènes anti- complémentaires	0	0	0	0	0	0	0	0
Souches sauvages ou atténuées	2/2 (1)	6/9	2/2		5/9	0/2		12/16
TOTAL par type	8/11		7/11			12/18		

(1) Numérateur : nombre d'antigènes utilisables (voir p. 21)
Dénominateur : nombre d'antigènes préparés

tigènes préparés avec ces deux dernières souches est insuffisant pour que l'on puisse conclure. Cependant il est à remarquer que la souche Mac Mullen avait déjà donné des résultats nuls sur cellules Hela.

b)- Influence de l'inoculat

Etudiant la dose infectieuse inoculée par rapport à la valeur de l'antigène obtenu, il n'existe pas de relation directe. Le tableau 23 montre un exemple de résultats obtenus avec le type 1 souche Sabin.

Le tableau 24 représente l'ensemble de nos résultats pour les trois types sur cellules HEp2. Il semble que la dose favorable soit plus élevée pour le type 3, soit de 700 à $1\ 300 \times 10^5$ DICT 50, ce qui correspond à une dose de 35 à 65 particules virales par cellules, ce qui est assez considérable en regard des doses utilisées par ARTZET (1960 - 4).

En fait il n'y a pas de relation directe entre la dose utilisée et la valeur de l'antigène obtenu mais il y a un minimum de particules infectieuses à utiliser, ce minimum étant assez élevé.

c)- Relation entre le pouvoir infectieux et le pouvoir de fixation du complément

Quelques antigènes préparés avec les souches atténuées de Sabin ont été titrés afin de comparer leur valeur en fixation du complément et leur titre infectieux.

Le tableau 25 montre un exemple de titrage effectué sur cellules T pour quelques antigènes de type 3 : il ressort qu'il n'y a pas de parallélisme entre le titre infectieux et la valeur de l'antigène obtenu.

d)- Conclusions

Sur 38 antigènes préparés sur cellules HEp2, aucun était anticomplémentaire. Le milieu de survie utilisé était le milieu D, milieu sans sérum à base d'hydrolysate de lactalbumine et enrichi en tryptose phosphate broth et en glucose. Mais peut être les cellules HEp2 ont-elles la propriété de ne pas fournir de pouvoir anticomplémentaire dans les conditions techniques utilisées.

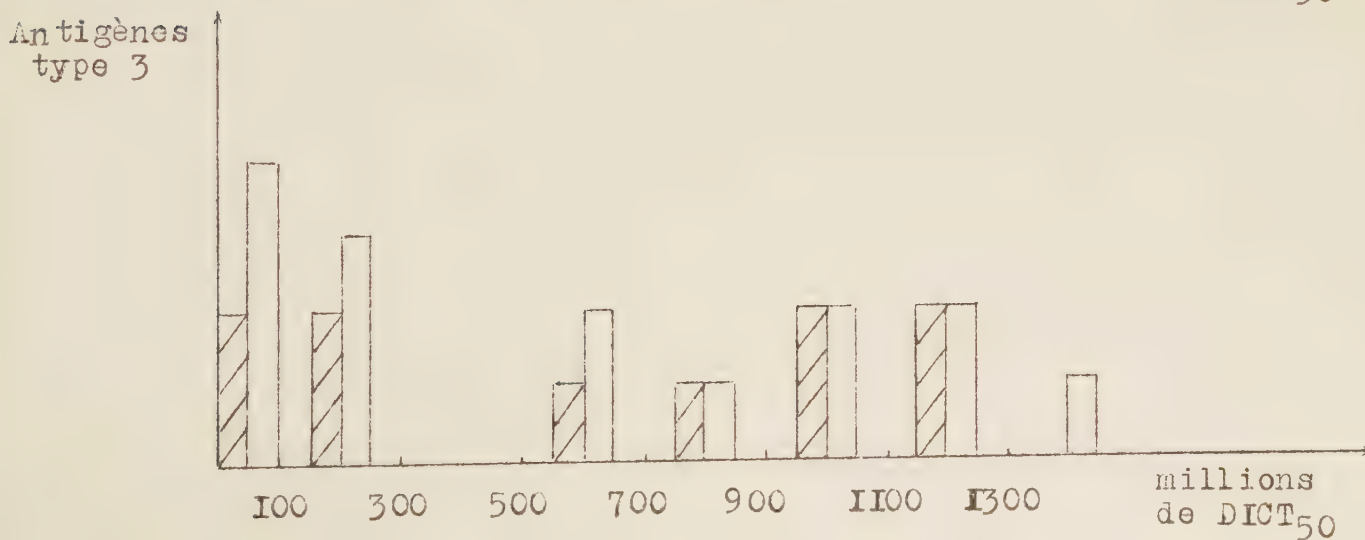
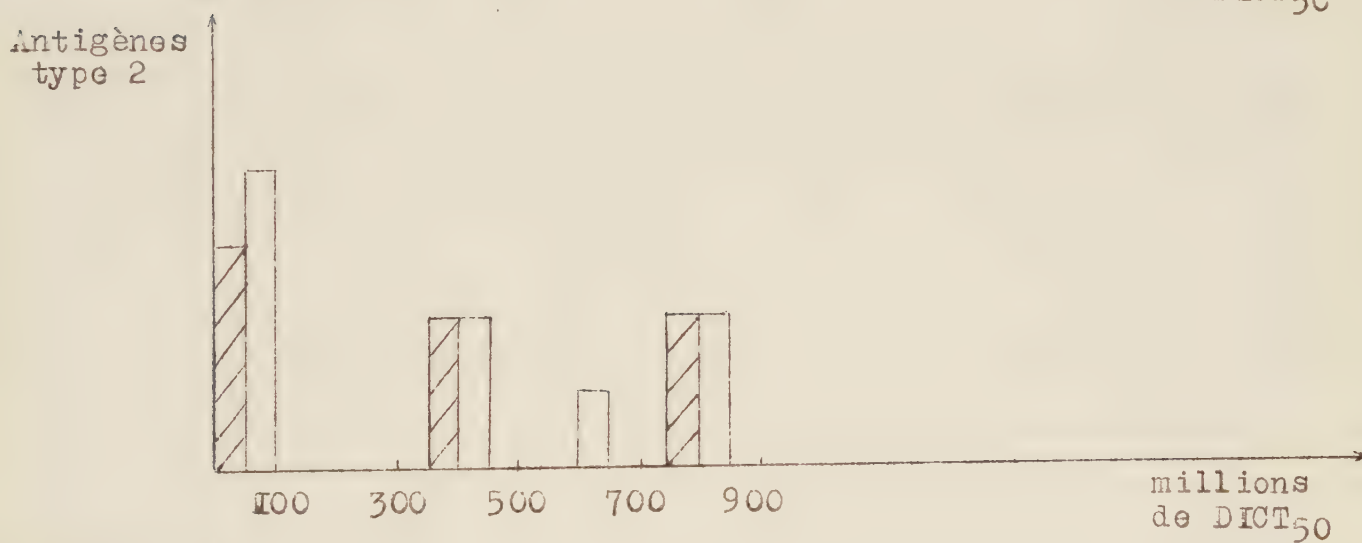
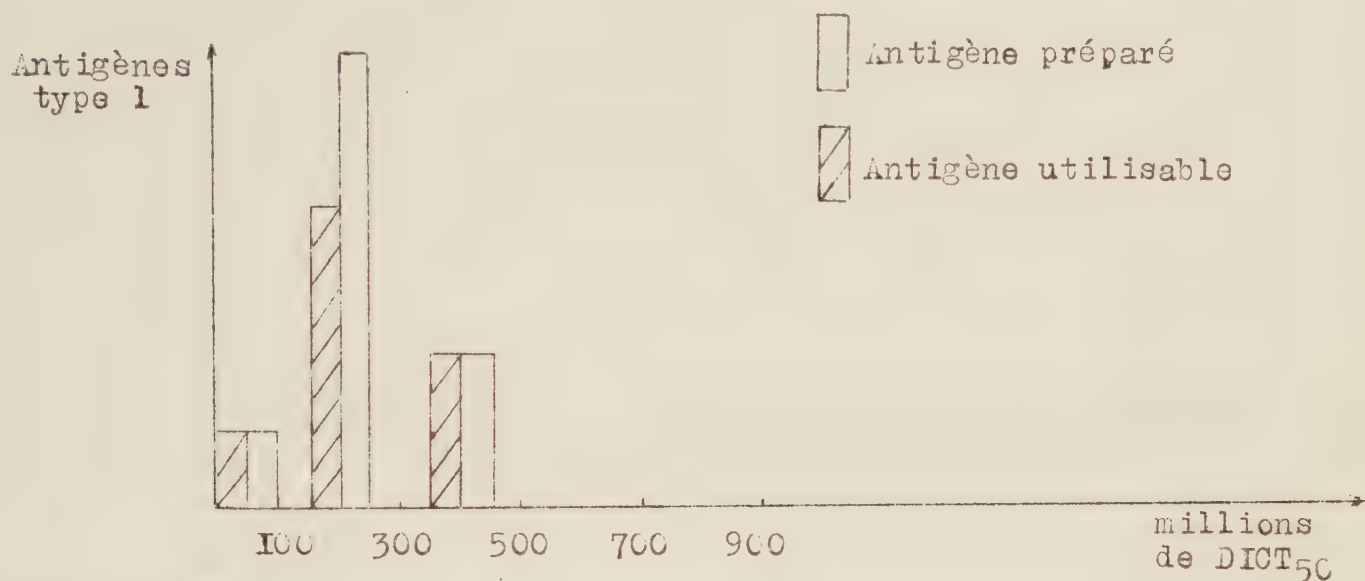
TABLERAU 23

Influence de l'inoculat sur les antigènes
obtenus avec la souche Sabin type 1

Numéro de l'antigène	Dose totale inoculée en millions de DICT ₅₀	Dose inoculée par cellule en DICT ₅₀	Valeur de l'antigène obtenu (1)
I-239c	36	18	B
I-235c	112	5,6	B
I-211c	151	8,4	F
I-212c	223	12,5	F
I-213c	223	12,5	B
I-229c	223	11	B
I-222c	363	20	B
I-217c	363	20	B
(1) B : antigène utilisable F : antigène de faible activité, non utilisable (voir p. 21)			

TABIEAU 24

Influence de la dose infectieuse totale inoculée
sur la valeur des antigènes obtenus sur cellules Hep₂



TABLERAU 25

Titre infectieux et valeur en fixation du complément
d'antigènes préparés sur cellules Hep2
avec la souche Sabin type 3

Numéro de l'antigène	Titre infectieux DICT ₅₀ (ml)	Valeur de l'antigène obtenu (1)
3-233c	IC-7,37	B
3-234c	IC-7,50	B
3-227c	IC-8	F
3-214c	IC-8,54	F
3-204c	IC-9	B
(1) B : antigène utilisable en fixation du complément (voir p. 21) F : antigène de faible activité en fixation du complément		

Sur les 38 antigènes préparés, 27 sont utilisables, ce qui nous donne un rendement total de 71 %. Ce rendement est sensiblement égal pour les trois types (tableau 22). En type 1 et 2, les souches atténuées donnent un rendement légèrement inférieur aux souches sauvages, alors qu'en type 3 les souches sauvages nous ont paru moins efficaces que la souche Sabin atténuée.

Enfin la qualité de l'antigène obtenu se révèle sans rapport avec la dose infectieuse inoculée et le titre infectieux obtenu.

III - Conclusions sur la méthode

Nous avons étudié 112 antigènes poliomyélitiques fixant le complément préparés par la méthode décrite par ARTZET (1960 - 3, 1960 - 4, 1961 - 5). Nous avons ainsi obtenu 69 antigènes utilisables (*) et 5 antigènes anticomplémentaires (*).

Le milieu de survie D à l'hydrolysate de lactalbumine enrichi (voir tableau 5) a été retenu comme très satisfaisant, sans doute en raison de l'absence de sérum animal et en raison de son enrichissement par du tryptose phosphate broth et du glucose.

Les cellules couramment utilisées sont les cellules Hela et les cellules HEp2. Le tableau 26 résume les résultats obtenus avec les différentes cellules utilisées. Les cellules KB sont sans doute excellentes dans leur capacité à produire des antigènes fixant le complément. Elles sont utilisées avec succès par ARTZET (1960 - 4).

Les cellules de rein de singe nous ont paru inefficaces. SCHMIDT et Coll. (1957 - 98) avaient déjà signalé que ces cellules donnaient des antigènes d'activité inférieure à ceux obtenus sur cellules Hela. 4 antigènes préparés sur cellules de rein de singe ayant été pratiquement inactifs en fixation du complément, ces cellules ont été abandonnées pour la préparation des antigènes fixant le complément.

Enfin les cellules Hela et cellules HEp2 se sont révélées satisfaisantes avec un rendement légèrement supérieur pour les cellules HEp2 qui ne nous ont pas fourni de pouvoir anticomplémentaire.

(*) - voir page 21

TABIEAU 26

Antigènes fixant le complément
préparés à partir du culot cellulaire
sur différentes cellules

	Antigènes préparés	Antigènes utilisables (1)	Antigènes anti- complémentaires
KB	1	1	0
Rein de singe	4	0	0
HeLa	65	33	5
Hep2	38	27	0
Total	108	61	5
(1) Voir p. 21			

Cependant une étude comparative résumée dans le tableau 27 montre que dans des conditions strictement identiques, c'est-à-dire avec le milieu de survie D (50 ml par boîte) et un inoculat de même type (10 à 15 ml de suspension virale diluée au 1/10) les cellules Hela et les cellules HEp2 ne présentent pas de différences sensibles d'activité. La seule variante dont nous n'avons pas tenu compte dans ce tableau est la dose infectieuse: nous avons montré précédemment que, pour l'une ou l'autre souche de cellules, les différentes doses infectieuses utilisées ne faisaient pas apparaître de différence d'activité dans les antigènes obtenus.

Les trois types de virus poliomyélitiques se montrent de valeur inégale dans leur faculté à produire des antigènes fixant le complément. Le tableau 27 montre que le rendement décroît du type 1 au type 3, le type 2 étant intermédiaire.

D'autre part, si l'on compare les antigènes préparés sur cellules Hela et HEp2 selon des conditions techniques identiques décrites plus haut, en fonction des souches utilisées, il apparaît que (tableau 28) les souches sauvages donnent en type 1 et 2 un rendement voisin de 100 %. Par contre, le rendement est inférieur avec les souches sauvages en type 3 et les souches atténuées dans les trois types.

Pour se mettre dans les meilleures conditions possibles il faudrait donc utiliser pour préparer des antigènes fixant le complément :

- en type 1 et type 2, des souches sauvages cultivées indifféremment sur cellules Hela ou HEp2,
- en type 3, des cellules HEp2 avec souche atténuée de Sabin.

Pour des raisons de sécurité, on préfère au Laboratoire d'Hygiène utiliser la souche atténuée dans les trois types.

TABLEAU 27

Comparaison des cellules HeLa et Hep₂
dans la production d'antigènes fixant le complément

Virus	HeLa		Hep2		Total par type
	Sauvage	Atténué	Sauvage	Atténué	
t 1	7/7 (1)	2/2	2/2	6/9	17/20
t 2	I/I	0/I	2/2	5/7	8/II
t 3	8/II	3/6	0/2	12/16	23/35
Total par souche	16/19	5/9	4/6	23/32	
Total par cellules	21/28		27/28		

(1) Nombre d'antigènes utilisables (voir p. 21
Nombre d'antigènes préparés

TABIEAU 28

Antigènes préparés sur cellules HeLa ou Hep2
avec des souches sauvages ou atténuées

Type	Souches sauvages	Souches atténuées
Type 1	9/9 (1)	8/II
Type 2	3/3	5/8
Type 3	8/I3	15/22
(1) $\frac{\text{Nombre d'antigènes utilisables}}{\text{Nombre d'antigènes préparés}}$ (voir p. 21)		

- CONCLUSIONS -

Nous avons comparé les résultats obtenus avec trois techniques de préparation des antigènes fixant le complément en poliomyélite.

Deux méthodes concernent des antigènes bruts :

- l'une, d'après SVEDMYR, fournit des antigènes d'activité insuffisante et très anticomplémentaires,

- l'autre, d'après SCHMIDT, peut donner de bons antigènes à condition d'utiliser un milieu de survie bien déterminé (liquide maniotique de bovidés enrichi par du tryptose phosphate broth 6 g/l et du glucose 0,9 g/l) et dépourvu de sérum animal. Au contraire SCHMIDT obtient de bons antigènes en présence de 2,5 % de sérum de singe. Mais il utilise un milieu moins riche, le milieu 199.

La méthode inspirée par ARTZET avec concentration de l'antigène dans le culot cellulaire est celle qui donne les meilleurs résultats. Utilisée sur cellules Hela ou HEp2, elle peut donner, même en présence de souches atténuées (Sabin) des antigènes actifs dilués au 1/15. Cette méthode est actuellement utilisée au Laboratoire d'Hygiène.

De notre étude sur cette technique, il ressort que les cellules de rein de singe sont impropres à la préparation d'antigènes fixant le complément, ainsi que l'avaient montré SCHMIDT et Coll. (1957 - 93). Aux cellules KB utilisées par ARTZET ont été substituées les cellules Hela et HEp2 dont l'activité est sensiblement identique. Notons que les cellules HEp2 ne nous ont jamais donné d'antigènes anticomplémentaires.

La présence de sérum animal dans le milieu de survie nous est apparu aussi nuisible avec cette méthode qu'avec la méthode de SCHMIDT, sauf lorsqu'on utilisait un milieu pauvre (milieu I tableau 5).

L'addition de glutamine et l'augmentation du taux de glucose dans le milieu de survie n'ont pas semblé efficaces.

La réduction du volume de milieu de survie se traduisait par une amélioration de l'antigénicité. Cette antigénicité est sans rapport avec le titre infectieux de l'antigène.

La quantité de virus à inoculer nous a semblé supérieure à celle utilisée par ARTZET, allant de 5 à 65 particules infectieuses par cellule contre 4 à 5 particules virales par cellules pour ARTZET.

Enfin, quelque soit la méthode utilisée, le rendement en antigène variable était maximum avec le type 1 souche Brunhilde ou Mahoney et minimum avec la souche Mac Mullen de type 3, à l'exception des antigènes préparés sur cellules HEp2 selon la technique avec extraction de l'antigène cellulaire: on observait dans ce cas un rendement supérieur en type 3 avec la souche atténuée de Sabin.

*

*

*

CH A P I T R E I I

ESSAIS DE CONCENTRATION ET PURIFICATION DES ANTIGENES

- INTRODUCTION -

La préparation des antigènes peut comporter certaines difficultés classiques :

- présence de substances étrangères au virus provenant des cellules et du milieu de culture, en particulier présence d'éléments ayant un pouvoir anti-complémentaire,

- obtention d'un titre antigénique suffisamment élevé.

Les difficultés sont apparues particulièrement au cours de la préparation des antigènes poliomyélitiques; on comprend alors que de nombreux travaux aient eu pour but de tenter de purifier ou de concentrer les antigènes, ou les deux à la fois si possible.

- Pour éviter ou supprimer le pouvoir anticomplémentaire des antigènes, on utilise le chauffage (SVEDMYR et Coll. 1952 - 114, 1953 - 115 , 1953 116), la dilution (BAUMEISTER et Coll. 1956 - 8) ou encore, mais sans succès, l'addition d'albumine bovine ou l'extraction par l'éther (SVEDMYR et Coll. 1952 - 114). Avec les fluorocarbones (hydrocarbones fluorés et chlorés commercialisés sous les noms de Freon 112 ($\text{C Cl}_2 \text{ F} - \text{C Cl}_2 \text{ F}$) ou Genetron 226 ($\text{C F}_2 \text{ Cl} - \text{C Cl}_2 \text{ F}$), on peut séparer les protéines étrangères du virus poliomyélitique (MANSON et Coll. 1957 - 68 , HAMPARIAN et Coll. 1958 - 48 , HALONEN et Coll. 1960 - 47).

- Pour obtenir un virus très pur on peut utiliser, la chromatographie sur résines échangeuses d'ions (HOYER et Coll. 1958 - 50 , 1959 - 51 , TAYLOR et Coll. 1958 - 122 , LEVINTOW et Coll. 1960 - 64)

- Le plus souvent on cherche à concentrer le matériel viral en même temps qu'on le purifie partiellement :

- . adsorption du virus sur un gel puis élution, l'adsorbant pouvant être constitué par du phosphate d'aluminium (FANTES 1962 - 31), de l'hydroxyde d'aluminium (SABIN 1932 - 90), de la Di-Ethyl-Amino-Ethyl cellulose (DEAE) (SUGGS et Coll. 1961 - 113).

. précipitation du matériel viral

par de l'acide nucléique (CHARNEY et Coll. 1961 - 20),
par du méthanol (POLLARD et Coll. 1949 - 81),
par acidification (SCHMIDT et Coll. 1959 - 99).

- D'autres méthodes purement physiques tendent essentiellement à concentrer l'antigène :

. SVEDMYR et Coll. (1952 - 114 , 1953 - 115 , 1953 - 116)
et BAULEISTER et Coll. (1956 - 8) concentrent par ultrafiltration sur colloïdion leurs antigènes poliomyélitiques pour fixation du complément.

. la pervaporation, dessiccation progressive et partielle sous l'action d'un courant d'air ou du vide, est utilisée pour le virus poliomyélitique (ALBANO 1961 - 1) pour titrer les vaccins par fixation du complément (POLSON et Coll. 1957 - 85 , WARREN et Coll. 1959 - 125) ou pour préparer des antigènes flocculants (SCHMIDT et Coll. 1959 - 99 , SELZER et Coll. 1962 - 106).

- Enfin il existe des méthodes complexes, telle celle de LEVINTOW et Coll. (1960 - 64) combinant pervaporation, ultracentrifugation et chromatographie, ou celle de SCHWERDT et Coll. (1956 - 103) avec précipitation du virus par le méthanol en milieu acide, élution à pH alcalin, extraction des lipides et protéines étrangères par le butanol, nouvelle précipitation du virus, ultracentrifugation et traitement par les nucléases pour éliminer les acides nucléiques non viraux.

Pour notre part, nous avons cherché :

. à améliorer certains antigènes préparés pour fixation du complément
en ôtant leur pouvoir anticomplémentaire,
en augmentant leur titre,

. à concentrer des antigènes poliomyélitiques en vue d'une réaction de floculation.

Pour cela, nous avons utilisé différentes méthodes déjà plus ou moins employées par les auteurs :

- A - Concentration par la méthode des deux phases.
- B - Lyophilisation.
- C - Traitement par le chlorure de cobalt.
- D - Dialyse contre le polyvinylpyrrolidone.
- E - Ultracentrifugation.

A - METHODE DES DEUX PHASES -

Une méthode très séduisante a été proposée par ALBERTSSON (1960 - 2) utilisant des macromolécules (polyéthylène glycol et sulfate de dextran). En faisant varier les concentrations des deux polymères, la concentration ionique et les volumes mis en présence, on peut concentrer par simple décantation le matériel viral dans l'une des phases. Cette méthode a été appliquée à divers virus par PHILIPSON et Coll. (1960 - 79).

Nous avons utilisé cette méthode pour concentrer deux liquides provenant de surnageants de cellules infectées par le virus poliomyélitique type I souche Sabin.

1°/- Dans une ampoule à décantation on agite à la main :

- 50 ml de liquide à concentrer
- 0,65 ml de solution de sulfate de dextran à 20 %
- 14 ml de solution de polyéthylène glycol à 30 %
- 28 ml de solution de chlorure de sodium 5 M (*)

On laisse sédimenter pendant trois heures, on recueille la couche inférieure qui contient le virus et le sulfate de dextran. Ce dernier est alors précipité par 7,5 % de chlorure de potassium 3M. Après une légère centrifugation, le surnageant est recueilli : il constitue l'antigène concentré.

(*) - Le volume de chlorure de sodium 5M à utiliser est calculé en tenant compte de la concentration du liquide à concentrer en chlorure de sodium, de façon à donner une concentration finale de 0,3 M.

Le tableau 29 indique les résultats obtenus. Le titre infectieux est passé de $10^{-7,16}$ /ml à $10^{-7,83}$ /ml pour une réduction de volume de 20 fois. Nous avons donc eu concentration du matériel viral.

2°/- Une deuxième expérience similaire a été faite dans une allonge de verre laissée en position verticale une nuit à + 4° C. Le tableau 29 indique les résultats obtenus. Le titre infectieux est passé de $10^{-6,55}$ à 10^{-6} /ml pour une réduction de volume de 187 fois (300 ml de liquide original ont donné 1,6 ml de liquide dit concentré). Le liquide de départ légèrement anticomplémentaire a donné un concentré fortement anticomplémentaire. Il est probable que la concentration a également porté sur les protéines étrangères au virus. Cette opération a donc été nulle vis-à-vis du but recherché.

Bien que la méthode d'ALBERTSSON nous semble intéressante, en particulier au stade industriel, nous l'avons abandonnée en raison des résultats insuffisants qu'elle nous donnait, mais surtout en raison du faible volume d'antigène concentré qu'elle fournissait, les volumes à concentrer étant obligatoirement limités par nos conditions de manipulation.

B - LYOPHILISATION -

POLLARD en 1951 comparait sur un antigène poliomyélitique préparé sur animal la concentration par ultracentrifugation et par lyophilisation. Si l'ultra-centrifugation lui fournissait un antigène fixant le complément moyennement actif, la lyophilisation donnait un matériel non antigénique et non infectieux.

Nous avons concentré par lyophilisation 40 ml d'une suspension virale constituée par le surnageant de cellules infectées de titre infectieux supérieur à $10^{-8,37}$ /ml. Le lyophilisat était repris par 2,3 ml d'eau distillée. On obtenait un liquide trouble que l'on centrifugeait 10 minutes à 3 000 tours/min. Le surnageant obtenu (concentré 17 fois) était très anticomplémentaire et titrait $10^{-7,16}$ /ml. Le culot émulsionné dans 1 ml de tampon phosphate à pH 7,2 (antigène concentré 40 fois) n'était pas anticomplémentaire mais ne possédait pas d'activité en fixation du complément : il titrait $10^{-6,50}$ /ml. Ces

TABLEAU 29

Concentration des antigènes poliomyélitiques
par la méthode des deux phases

	Volume en ml	Concen- tration	Titre infectieux par ml	Fixation du complément
<u>Expérience 1</u>				
Liquide original	50	-	IC ^{-7,16}	NF (1)
Antigène obtenu	2,5	20	IC ^{-7,83}	NF
<u>Expérience 2</u>				
Liquide original	300	-	IC ^{-6,55}	lég ^t . AC (2)
Antigène obtenu	1,6	187	IC ⁻⁵	très AC
(1) NF : non fait				
(2) AC : anticomplémentaire				

résultats sont résumés dans le tableau 30 .

Cette méthode, conformément aux travaux de POLLARD, se montre donc inefficace pour concentrer les antigènes poliomyélitiques, sans doute en raison de la sensibilité du virus poliomyélitique à la lyophilisation. Cependant nous avons noté une baisse du titre infectieux mais non une disparition totale telle que l'avait observée POLLARD (1951 - 83).

C - TRAITEMENT PAR LE CHLORURE DE COBALT -

A la suite des travaux de GROSSOWICZ et Coll. (1960 - 46), nous avons traité une suspension de virus poliomyélitique (type I souche Sabin) constituée par le surnageant de cellules infectées.

400 ml sont additionnés lentement d'une solution (4,8 ml) de chlorure de cobalt M de façon à donner une concentration finale d'environ 1 mg de cobalt par ml. On observe alors un précipité bleu-violet. Le tout est laissé une nuit à + 4° C. Le lendemain le culot d'une centrifugation légère (5 minutes à 3 000 tours/minute) est repris par 8 ml de tampon de Hinc Ilvaine pH 5,2 puis mis à dialyser une nuit à + 4° C contre ce tampon pour ôter le cobalt. Une nouvelle dialyse 48 heures à + 4° C contre un tampon phosphate isotonique pH 7,2 permet de relever le pH à 7,2 en vue de la réaction de fixation du complément. Le dialysat est alors centrifugé 5 minutes à 3 000 tours/minute. Le surnageant recueilli (11,5 ml) constitue l'antigène concentré.

Le tableau 31 indique les titres infectieux et l'activité en fixation du complément du liquide original, du surnageant de la précipitation par le sel de cobalt et de l'antigène concentré obtenu. On a donc concentré le pouvoir infectieux sans réussir à récupérer une activité en fixation du complément.

D - DIALYSE CONTRE UNE SOLUTION DE POLYVINYLPIRROLIDONE -

En 1955, MORET et coll. (73) avaient décrit la possibilité de concentrer des liquides par dialyse contre des macromolécules. Cette méthode a reçu de nombreuses applications.

Les macromolécules utilisées le plus souvent sont le polyvinylpyrroli-

TABLÉAU 30

Lyophilisation d'un antigène poliomyélitique

	Volume en ml	Concen- tration (1)	Titre infectieux par ml	Valeur en fixation du complément
Liquide original	40	-	$\geq 10^{-8,37}$	C
Lyophilisat repris Surnageant	2,3	17	$10^{-7,16}$	PAC (2)
Culot émulsionné	1	40	$10^{-6,50}$	C
(1) Rapport $\frac{\text{volume de départ}}{\text{volume obtenu}}$				
(2) PAC : pouvoir anticomplémentaire				

TABIEAU 31

Traitement par le chlorure de cobalt d'un antigène poliomyélitique

	Volume en ml	Concen- tration	Titre infectieux par ml	Valeur en fixation du complément
Liquide original	400	-	$10^{-6,71}$	0
Surnageant de précipitation	environ 400	0	$10^{-6,37}$	0
Antigène obtenu	11,5	34	$10^{-7,08}$	0

done (PVP) et le polyéthylène-glycol (PEG). Le PVP fut utilisé en 1958 par MAC KENNA et Coll. (52) pour concentrer un antigène poliomyélitique en vue d'une réaction d'hémagglutination. Le PEG est utilisé par ALBANO (1961 - 1) et BUCCA et Coll. (1960 - 14) pour concentrer divers virus dont le virus poliomyélitique. BEALE et Coll. (1962 - 9) l'utilisent pour concentrer des antigènes poliomyélitiques en vue de l'étude par floculation en gélose des antigènes C et D.

PLAN et Coll. (1961 - 80) ayant montré que, contrairement au PVP le PEG, irrégulièrement polymérisé, peut partiellement traverser les membranes celluloses, nous avons choisi d'utiliser le PVP.

MATIERIEL:

1°/- Le polyvinylpyrrolidone.

Nous avons utilisé soit la solution commerciale à 25 % (Subtosan), soit la poudre sèche que l'on dissolvait dans de l'eau distillée à chaud. Dans les deux cas, l'ébullition permettait d'obtenir la concentration désirée, de 15 à 30 %, tout en stérilisant la solution.

2°/- L'appareillage.

On utilise un boyau de cellophane formé dans sa partie inférieure par un simple noeud et enfilé dans sa partie supérieure sur un tube de verre de diamètre correspondant. L'ensemble est fermé par un bouchon de caoutchouc percé d'un petit tube de verre obturé par du coton afin de permettre l'équilibre des pressions entre l'intérieur et l'extérieur de l'appareil pendant la stérilisation et la dialyse. Le tout est stérilisé dans un récipient fermé, à l'autoclave. Au moment de la manipulation, la fixation du boyau sur le verre est consolidée par du ruban adhésif.

TECHNIQUE :

On introduit aseptiquement le liquide à concentrer dans le boyau grâce au bouchon de caoutchouc. Le tout est alors plongé dans une solution de PVP

contenue dans une éprouvette de 250 ml.

La dialyse s'effectue à + 4° C et dure en moyenne 18 à 24 heures avec une concentration approximative de 10 volumes. Dans certains cas indiqués, la concentration avait été très rapide et le concentré obtenu était repris par un tampon phosphate isotonique à pH 7,2.

Le liquide concentré est recueilli aseptiquement par pipettage direct dans le boyau.

RESULTATS:

Nous avons concentré selon cette technique une suspension de virus poliomyélitique (type I souche Sabin) provenant d'un surnageant de cellules infectées.

Le tableau 32 indique les résultats obtenus: le titre infectieux est passé de $10^{-6,37}$ à $10^{-6,83}$ par ml. Dans le même temps un tube témoin restait à + 4° C pendant toute l'opération: son titre infectieux est de 10^{-6} / ml. La concentration en volume étant de 9,1 et le titre infectieux augmentant de 10^{-6} à $10^{-6,83}$ (soit de 0,83 log), on peut considérer que la perte en virus est relativement faible. L'antigène est nul en fixation du complément, le concentré obtenu étant fortement anticomplémentaire.

CONCLUSIONS:

La dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone permet d'obtenir en 24 heures une réduction de 10 volumes ou plus, une concentration se traduisant par l'augmentation du titre infectieux des antigènes poliomyélitiques. Au point de vue fixation du complément, l'intérêt de cette technique est nul puisque l'antigène obtenu est très anticomplémentaire, contrairement à ce qui avait été observé avec des antigènes de grippe, d'oreillon et d'herpès (LEKA et Coll. 1956 - 61).

E - ULTRACENTRIFUGATION -

L'ultracentrifugation est largement utilisée pour concentrer de fines

TABIEAU 32

Antigène poliomyélique concentré par dialyse

	Volume en ml	Concen- tration (1)	Titre infectieux par ml	Valeur en fixation du complément
Liquide original	102	-	$10^{-6,37}$	0
Liquide concentré	11,2	9,1	$10^{-6,83}$	PAC (2)
(1) Rapport $\frac{\text{volume initial}}{\text{volume obtenu}}$				
(2) PAC : pouvoir anticomplémentaire				

particules non sédimentables par centrifugation simple. Elle est en particulier couramment utilisée pour le virus poliomyélitique, plus spécialement pour la préparation d'antigènes flocculants (LE BOUVIER 1957 - 53 , GRASSET et Coll. 1958 - 43 , SCHMIDT et Coll. 1959 - 99 , SMITH et Coll. 1959 - 111 , BEALE et Coll. 1962 - 9), pour l'obtention d'antigènes fixant le complément (BLACK et Coll. 1954 - 10 , BAUNEISTER et Coll. 1956 - 8) ou pour étudier la fraction active en fixation du complément après action du formol (BLACK et Coll. 1955 - 11 , WARREN et Coll. 1959 - 125, PAPAPANAGIOTOU et Coll. 1961 - 78) ou de la chaleur (SCHMIDT et Coll. 1956 - 96).

MATERIEL ET METHODE :

Nos centrifugations sont conduites sur une centrifugeuse angulaire Martin-Christ type Oméga, rotor 9.520 (tubes en hostalen de 10 ml) et rotor 9.530 (tubes en hostalen de 30 ml).

Le champ centrifuge appliqué au centre de gravité du tube à centrifuger est exprimé en g. Pour faciliter les comparaisons d'une opération à l'autre, nous faisons intervenir le facteur temps en utilisant l'expression g. par minute proposée par DE DUVE et Coll. (1953 - 23).

RESULTATS :

Nous avons concentré par ultracentrifugation 10 surnageants de cellules infectées par du virus poliomyélitique : type I souche sauvage Brunhilde et souche atténuée de Sabin, type III souche sauvage Mac Mullen.

1°/- Influence des adjuvants de centrifugation.

BARON (1957 - 7) ayant montré que la présence de sérum de veau (2 %) ou de gélatine (0,015 %) dans le liquide à centrifuger favorise la concentration du virus poliomyélitique dans le culot de centrifugation, nous avons adopté de façon systématique l'addition de gélatine, le sérum de veau pouvant contenir des inhibiteurs (BARON 1957 - 7). En effet, une étude comparative de centrifugation avec ou sans gélatine nous avait permis de constater que la gélatine n'augmentait pas la concentration mais permettait d'obtenir un cu-

lot bien formé et facilitait la décantation du surnageant (tableau 33 , antigène n° 1-179). Par ailleurs, un antigène (1-208) ultracentrifugé avec du sérum de veau se révélait fortement anticomplémentaire.

2°/- Influence de la concentration.

On désigne par concentration le rapport

$$\frac{\text{volume du liquide original centrifugé}}{\text{volume dans lequel le culot est repris}}$$

Le tableau 34 montre que l'augmentation du titre infectieux est en relation avec la concentration selon un rapport difficile à prévoir.

3°/- Influence du mode de centrifugation.

Afin de pouvoir comparer nos ultracentrifugations pour lesquelles vitesse, temps et modèle de rotor variaient, nous avons utilisé la formule de DE DUVE et Coll. (1953 - 23) exprimée en g/minute qui tient compte de ces différents facteurs.

La tableau 35 montre que l'augmentation du titre infectieux observé est en rapport avec les conditions de centrifugation exprimées en millions de g/minute.

CONCLUSIONS:

Le tableau 33 montre que toutes nos ultracentrifugations d'antigènes poliomyélitiques ont eu pour effet l'augmentation du titre infectieux.

Au point de vue fixation du complément, sur 7 antigènes titrés :

- 2 sont utilisables après ultracentrifugation,
- 3 ont acquis ou augmenté leur pouvoir anticomplémentaire,
- 2 n'ont pas acquis de titre suffisant.

Cette méthode de concentration est donc relativement peu efficace pour l'obtention d'antigènes fixant le complément avec le virus poliomyélitique. Au contraire, avec le virus ourlien nous avons obtenu d'excellents résultats.

Ultracentrifugation d'antigènes poliomyélitiques

N° de l'anti- gène	Souche	TECHNIQUE			R E S U L T A T S				
		Adj	g/min	C ⁿ	Titre infectieux (°)			Fixation du complément	
					D	S	C	D	C
I-I79	Brunhilde	C	21,5	10	8,37	7,37	9,37	NF	NF
I-I79	Brunhilde	g	21,5	10	8,37	7,00	9,62	NF	NF
I-217	Sabin	g	22,1	12,5	7,91	5,55	8,71	O	F
I-217	Sabin	g	22,1	35	7,91	5,16	9,21	O	I/4
I-106	Brunhilde	g	35,7	8,6	8,62	6,83	9,20	O	AC ++
I-107	Brunhilde	g	35,7	8,6	8,68	5,31	8,75	O	F
I-235	Sabin	g	44,2	80	7,50	5,31	9,50	NF	NF
I-213	Sabin	g	50,1	50	7,68	5,16	9,33	O	I/3
I-208	Sabin	v	68	47	7,16	5,50	8,83	AC +	AC ++
3-132	McMullen	g	33,6	5	8	6,37	8,62	O	AC ++

Adj : adjuvant de l'ultracentrifugation
g : gélatine v : sérum de veau

g/min : millions de g par minute

Cⁿ : Rapport $\frac{\text{volume de départ}}{\text{volume obtenu}}$

D : liquide de départ S : surnageant d'ultracentrifugation

C : culot d'ultracentrifugation (antigène concentré)

NF : non fait F : titre faible

AC : + légèrement anticomplémentaire

++ très anticomplémentaire

(°) Titre infectieux par ml exprimé par le logarithme
de la DICT₅₀ changé de signe (exemple pour 10^{-8,37} : 8,37)

Influence de la concentration sur le titre infectieux
des antigènes polionyélitiques ultracentrifugés

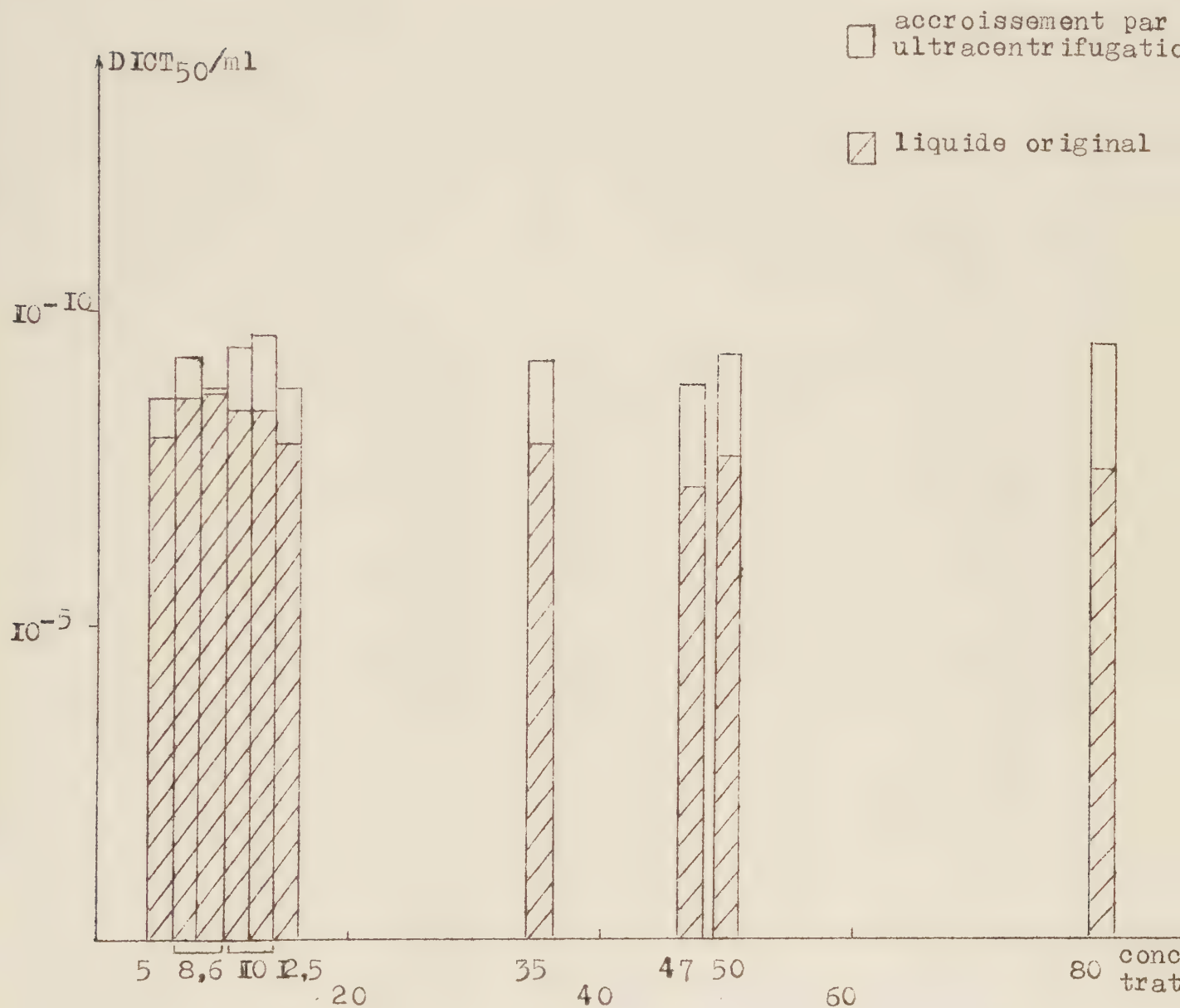
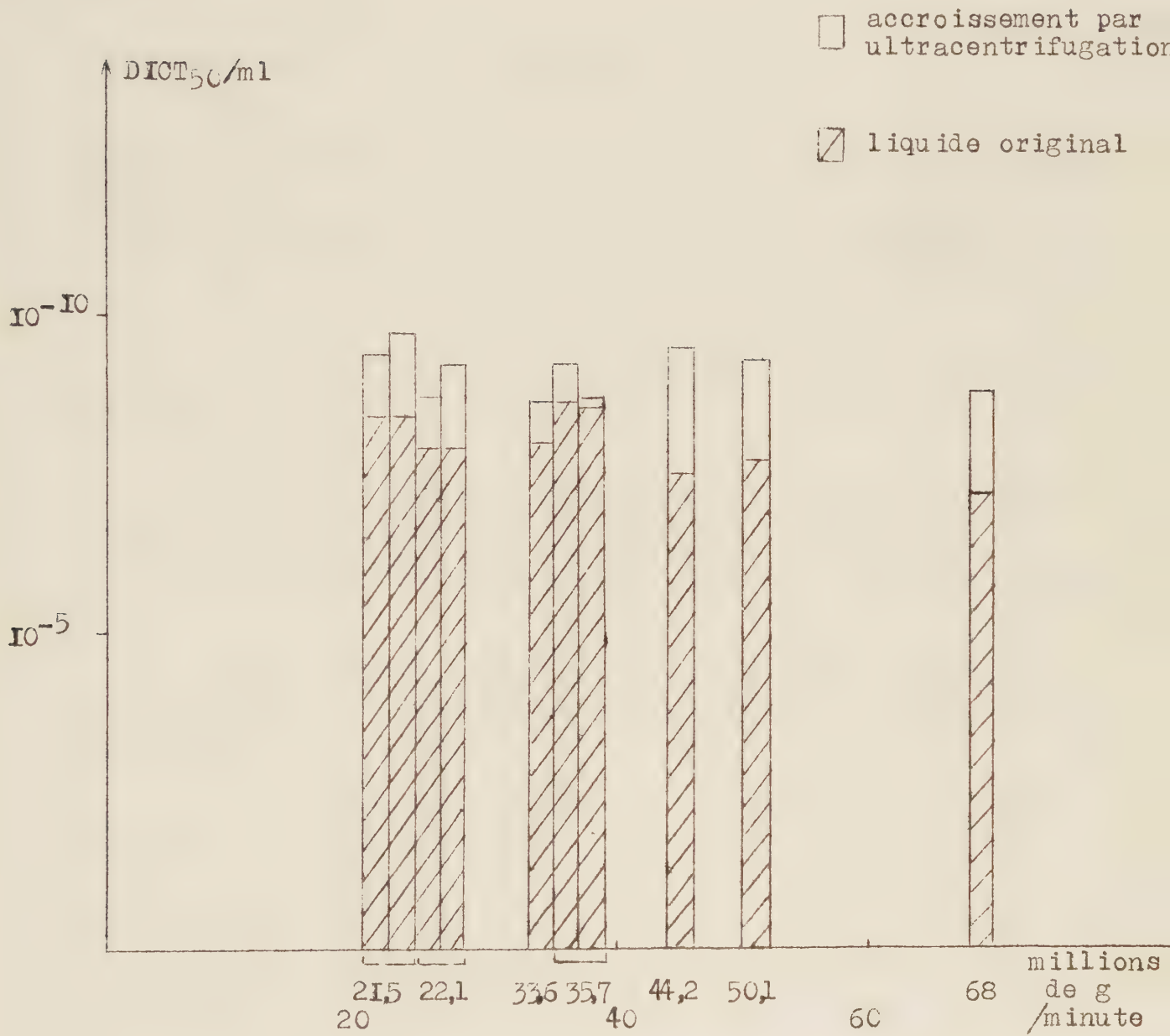


TABLEAU 35

Influence de l'ultracentrifugation sur le titre infectieux
des antigènes poliomyélitiques



tats. Il est possible que la différence de taille de ces deux virus joue un rôle, mais il est probable que différents facteurs interviennent qui ne paraissent d'ailleurs pas actuellement tous connus. En effet on n'a pu à ce jour préciser tous les facteurs qui, pour les antigènes poliomyélitiques, interviennent pour fixer le complément en présence d'un sérum contenant les anticorps homologues.

- CONCLUSIONS -

En dehors de la lyophilisation qui s'est montrée non seulement inefficace mais nuisible (diminution du titre infectieux) les différentes méthodes de concentration que nous avons utilisées nous ont toutes donné une concentration relative de nos antigènes poliomyélitiques appréciée par titrage infectieux.

Cependant ces concentrations ne vont pas sans inconvénients :

- La concentration n'est pas théorique, c'est-à-dire que si l'on considère le volume de départ et le volume obtenu, il existe toujours des "pertes" souvent non négligeables.

- Le volume d'antigène concentré fourni par ces différentes méthodes est assez faible pour nos conditions de manipulation. La rentabilité de ces opérations est donc presque nulle dans la pratique courante du laboratoire diagnostic.

- Le plus souvent la concentration du matériel viral s'accompagne de la concentration de substances gênantes entraînant l'apparition ou l'augmentation de pouvoir anticomplémentaire.

Il semble donc qu'il soit préférable de préparer de nouveaux antigènes plutôt que d'essayer de concentrer un antigène trop faible. On comprendra alors que les recherches aient été dirigées non pas vers la mise au point de méthodes de concentration et de purification mais, au moins pour la pratique du diagnostic, vers l'étude des facteurs permettant d'obtenir directement des antigènes bruts ayant un titre suffisant et un faible pouvoir anticomplémentaire.

*

*

*

CHAPITRE III

ESSAIS DE FLOCCULATION AVEC LE VIRUS POLIOMYELITIQUE

- INTRODUCTION -

Le terme de floculation désigne la formation d'aggrégats en présence d'anticorps spécifiques par des antigènes viraux, qu'il s'agisse de suspensions virales ou d'antigènes "solubles" ou la combinaison des deux. Cette réaction se différencie de l'agglutination où l'antigène est relativement gros et directement visible au microscope ordinaire et de la précipitation qui doit être réservée aux réactions correspondant à un antigène "soluble" (SCHMIDT et Coll. 1961-100).

Cette réaction avait depuis longtemps été recherchée pour le virus poliomyélitique à l'aide d'antigènes préparés sur animal mais sans succès (RAFFEL et Coll. 1940 - 86, KOLIER et Coll. 1935 - 54, HARRISON, 1939 - 49). En effet, cette réaction nécessite le plus souvent la préparation d'antigènes concentrés :

- soit par la méthode de SCHWERDT et SCHAFER (1956 - 103) utilisée par Le BOUVIER (1957 - 57),
- soit par pervaporation utilisée par SCHMIDT et Coll. (1959 - 99) et par SELZIER et Coll. (1962 - 106),
- soit par dialyse contre du poly-éthylène-glycol (BEALE et Coll. 1962 - 9),
- soit par précipitation à pH 4,3 et élution à pH 8,0 (SCHMIDT et Coll. 1959 - 99),
- soit le plus souvent par ultracentrifugation, qu'il s'agisse de fluculation en gélose (Le BOUVIER et Coll. 1957 - 58, GRASSET et Coll. 1958 - 43 et 1962 - 44, PACCAUD et Coll. 1960 - 76 et 77, BEALE et Coll. 1962 - 9) ou en milieu liquide (SMITH et Coll. 1956 - 109 et 110, 1959 - 111, SCHMIDT et Coll. 1959 - 99, EGGERS et Coll. 1961 - 27 et 28).

Cependant certains auteurs ont montré que la concentration était inutile (SMITH et Coll. 1959 - 111, SEGAGNI et Coll. 1960 - 104) à condition d'utiliser des antigènes suffisamment puissants, c'est-à-dire titrant environ

10^8 DICT 50 par ml, l'ultracentrifugation d'un antigène ne modifiant pas le titre flocculant des sérums mais augmentant seulement la taille des flocculats (CHURCHER et Coll. 1959 - 21). Ceci est en contradiction avec les travaux de SMITH et Coll. (1959 - 111) qui améliorent par ultracentrifugation les antigènes non flocculants.

Nous avons donc choisi d'utiliser des antigènes non concentrés, quelques essais de concentration par ultracentrifugation nous ayant donné des antigènes peu flocculants mais présentant de nombreux artéfacts.

- MATERIEL -

I - LES ANTIGENES

Les antigènes sont préparés soit sur cellules de rein de singe (*Macacus Cynomolgus* ou *Cercopithecus Aethiops*), soit sur cellules HEp2 (voir chapitre I : Matériel pour l'obtention des antigènes). Contrairement aux observations de CHURCHER et Coll. (1959 - 21), les cellules de rein de singe nous donnaient des antigènes flocculants.

Nous avons utilisé deux catégories d'antigènes :

a)- antigènes fixant le complément préparés par extraction du culot cellulaire ainsi qu'il est décrit au chapitre I (Antigènes concentrés),

b)- antigènes préparés pour floculation

I - soit simple remise en suspension des cellules au moment du recueil des antigènes suivie d'une centrifugation légère pour éliminer ces cellules,

II - soit ultracentrifugation en présence de gélatine de suspensions virales peu concentrées. Les culots obtenus étaient remis en suspension dans un tampon phosphate pH 7,2 isotonique (voir page 101). Ils étaient flocculants mais nous avons abandonné cette technique en raison de la faible quantité d'antigènes fournie et la présence d'artéfacts observés au microscope,

III - soit la méthode que GRASSET et Coll. (1962 - 44) utilisent sur cellules KB et que nous avons adaptée aux cellules HEp2.

Tous ces antigènes inoculés avec du virus de type 1 souche Sabin titraient de $10^{8,15}$ à plus de $10^{9,50}$ DICT 50 par ml. Tous étaient flocculants. Cependant ceux préparés selon la première technique (antigènes pour fixation du complément) nous ont paru les meilleurs de façon relativement empirique, notre méthode n'étant pas quantitative. Il est à remarquer que ce pouvoir flocculant est sans relation avec la valeur de ces antigènes en fixation du complément.

Parallèlement des antigènes dépourvus de virus étaient préparés et nous

fournissaient nos antigènes témoins négatifs.

Aucun antigène n'était chauffé, EGGERS et Coll. (1961 - 27) ayant montré la disparition du pouvoir flocculant par chauffage de l'antigène. Ils étaient conservés à - 20° C et centrifugés à 2 000 tours/minute pendant cinq minutes avant l'emploi.

II - LES SÉRUMS

Les sérums sont conservés congelés à - 20° C et centrifugés à 2 000 tours/minute pendant cinq minutes avant l'emploi dans la réaction de flocculation. Ils sont alors utilisés non décomplémentés, les auteurs n'étant pas d'accord quant à l'incidence du chauffage sur le pouvoir flocculant des sérums (EGGERS et Coll. 1961 - 27, LE BOUVIER, 1957 - 58).

A - Origine des sérums

1°/- Sérums de référence flocculants

Ce sont des sérums flocculants connus fournis par le Dr. SABIN sous les numéros :

Type 1 (LSc) 59 + 60; 11 - 20 - 56

Type 2 (P712, ch, 2ab) 65 + 66 + 67; 11 - 16 - 58

Type 3 (Léon, 12ab) 71 + 73; 1 - 16 - 58

préparés par hyperimmunisation de lapins (EGGERS et Coll. 1961 - 27).

2°/- Sérums de référence neutralisants

a)- Sérums animaux :

Ce sont des sérums de lapin ou de poule préparés au Laboratoire d'Hygiène par hyperimmunisation selon la technique de FRENCH et Coll. (1960 - 35) avec du virus atténué de Sabin type 1 cultivé sur cellules HEP2.

b)- Sérums humains :

Les sérums humains avaient deux origines :

- Sérums adressés au laboratoire pour réaction de fixation du

complément avec les virus neurotropes (poliomyélitiques, oreillon, herpès).

- Etude de la vaccination par le vaccin buccal chez les enfants d'une crèche selon le schéma suivant : administration de deux doses vaccinales espacées de huit semaines et prélèvement de sang le jour de la première vaccination (jour 0) et douze semaines après, soit 84 jours après le début de la vaccination et 28 jours après la deuxième ingestion (BRIGAUD, 1963 - 14).

3°/- Sérums témoins

a)- Sérums animaux :

Nous avons utilisé du sérum de lapins dit "normaux", c'est-à-dire n'ayant subi aucune injection quelle qu'elle soit, et du sérum de cobayes également "normaux" recueilli pour l'obtention de complément.

b)- Sérums humains:

Nous avons considéré comme sérums témoins les sérums de nourrissons prélevés avant vaccination (BRIGAUD, 1963 - 14) et dont l'absence de contact avec le virus poliomyélitique était établi par la concordance des trois caractères négatifs suivants :

- absence de virus poliomyélitique dans les selles le jour du prélèvement de sang,
- absence d'anticorps fixant le complément dans le sérum prélevé,
- absence d'anticorps neutralisants (titre inférieur à 4, voir plus loin) dans le sérum prélevé.

B - Titration des sérums

1°/- Titration des anticorps fixant le complément

La méthode utilisée est celle décrite au chapitre I. On opère avec des dilutions du sérum à titrer ainsi qu'il est indiqué pour les sérums de référence.

Le titre d'un sérum est exprimé par l'inverse de la dilution de ce sérum qui donne 50 % d'hémolyse (lecture à deux croix) en présence d'un antigène de référence.

2°/- Titration des anticorps neutralisants

On utilise des cubes de culture de cellules T décrits au chapitre I (page 11 et 24).

Les sérums sont dilués de 1/2 en 1/2 à partir de la dilution initiale 1/4 : soit 1/4, 1/8, 1/16..... 1/256.

La suspension de virus est diluée de telle sorte qu'elle contienne environ 100 DICT 50 /ml calculée selon la formule de REED et Coll. (1938 - 87).

La neutralisation consiste :

- à mélanger 0,25 ml de sérum à expertiser et 0,25 ml de la suspension de virus contenant 100 DICT 50,
- à laisser en contact trois heures à 37° C,
- à mettre 0,2 ml de mélange sérum-virus dans deux tubes de cultures cellulaires contenant 1 ml de milieu de survie.

Dans chaque série de neutralisation :

- . le titre du virus est contrôlé par deux méthodes :
 - * titre du virus avant utilisation pour la neutralisation,
 - * contrôle de la dilution de neutralisation (100 DICT 50) par titrage à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .
- . des sérums de référence pour les trois types de titres connus sont engagés (dilution de 1/2 en 1/2). Leur titre neutralisant doit être retrouvé à une dilution près.

Le contrôle de tous les tubes est fait à 24 heures. Au quatrième jour, l'effet cytopathogène est observé dans les tubes correspondants au titrage

du virus et à la neutralisation des sérums de référence. La lecture finale de l'effet cytopathogène est faite à sept jours.

Le titre des sérums est exprimé par l'inverse de la plus haute dilution de sérum qui empêche la destruction des cellules en présence de 100 DICT 50 de virus.

3°/- Le diluant

Le diluant utilisé est celui préconisé par EGGERS et Coll. (1961 - 27), solution tampon isotonique de pH 7,2.

- METHODE DE FLOCCULATION -

Nous utilisons des plaques de plexiglass de 5 x 30 x 70 mm creusées chacune de façon à obtenir deux cupules de 10 mm de diamètre et de 1,4 mm de profondeur (volume 110 mm³ environ). Ces cupules sont entourées d'une rainure de sécurité de 14 mm de diamètre; elles sont espacées de 23 mm. Ces plaques sont stérilisées par exposition trente minutes au rayonnement ultraviolet puis emplies aseptiquement par des volumes égaux d'antigène et de sérum. Chaque cupule est alors fermée par une lamelle de 20 x 20 mm dégraissée et stérilisée par de l'éther. La lamelle est ensuite lutée par de la paraffine afin d'éviter toute évaporation. Le tout est laissé à 37° C une nuit, soit environ 16 heures avant la lecture.

Lecture :

Nous utilisons un microscope à contraste de phase grossissant 240 fois.

Les antigènes étant toujours centrifugés cinq minutes à 2 000 tours/minute au moment de l'emploi, nous obtenons des témoins antigènes optiquement vides.

Par contre, nous avons eu des difficultés avec les sérums, la conservation de ceux-ci à l'état congelé (-20° C) au-delà de huit mois pouvant amener la formation d'un trouble qui ne peut être éliminé par centrifugation douce (2 000 tours/minute pendant cinq minutes). La filtration de ces sérums pouvait être un remède à cet état de chose mais elle entraînait un gaspillage important de sérum ou une dilution incompatible avec notre réaction.

On pouvait également observer à la lecture de gros agrégats réfringents visibles en surface non spécifiques car ils étaient retrouvés dans les témoins sérum + diluant.

Les flocculats spécifiques se présentaient finement granuleux, peu brillants, régulièrement dispersés et sédimentés sur le fond de la cupule. Nous avons considéré comme positives les réactions présentant des flocculats nettement agglomérés. Elles sont exprimées par une croix. Les flocculats très fins et douteux étaient considérés comme négatifs.

- RESULTATS -

A - LES TEMOINS

Toutes nos réactions comportaient plusieurs témoins :

1°/- Antigènes et sérums étaient mis en présence d'un tampon phosphate isotonique stérile pH 7,2 (EGGERS et Coll. 1961 - 27), ce tampon pouvant servir aux dilutions éventuelles. Tous les antigènes convenablement centrifugés se présentaient optiquement vides. Les sérums observés troubles malgré la centrifugation étaient rejetés.

2°/- Tous les sérums étaient mis en présence d'un antigène dit "témoin", c'est-à-dire préparé dans les mêmes conditions que l'antigène réactif mais exempt de virus. Le plus souvent, ces témoins ne présentaient pas de floculation. Cependant dans quelques cas, nous avons observé des floculations non spécifiques :

- avec le sérum de lapin hyperimmunisé préparé au laboratoire, les antigènes obtenus sur cellules HEp2 donnaient des floculats abondants. L'immunisation de ces animaux ayant été faite par du virus cultivé sur cellules HEp2, il s'agissait vraisemblablement d'anticorps anticellules HEp2 gênant la réaction. En effet, le sérum ne présentait pas de floculation avec les antigènes témoins préparés sur cellules de rein de singe. Ce phénomène n'a pas été observé avec le sérum de poule ni avec le sérum de lapin fourni par Sabin qui utilisait sans doute du virus cultivé sur cellules de rein de singe.

- avec le sérum d'un sujet présentant des titres en fixation du complément de 16 pour le type 1, inférieur à 8 pour le type 2, et 16 pour le type 3 (voir page 100), nous avons observé une floculation non spécifique en présence de nos antigènes témoins préparés sur cellules de rein de singe, sans que l'on puisse expliquer le phénomène. On pourrait supposer que ce malade a été vacciné préalablement, le vaccin étant préparé sur de telles cellules. Mais nous n'avons pas retrouvé ce phénomène avec d'autres sérums, certains ayant

été vaccinés sous notre contrôle par du vaccin poliomyélitique injectable.

3°/- Dans chaque réaction la valeur de nos antigènes était vérifiée :

- en présence de sérum dit "négatif" (voir plus haut) qui n'ont jamais donné de floculation,

- en présence de sérums floculants connus animaux (sérums de lapins hyperimmunisés) ou humains (sérums de sujets atteints de poliomyélite aiguë).

B - LES SÉRUMS EXPERTISES

1°/- Sérums animaux

a)- Sérum de poule

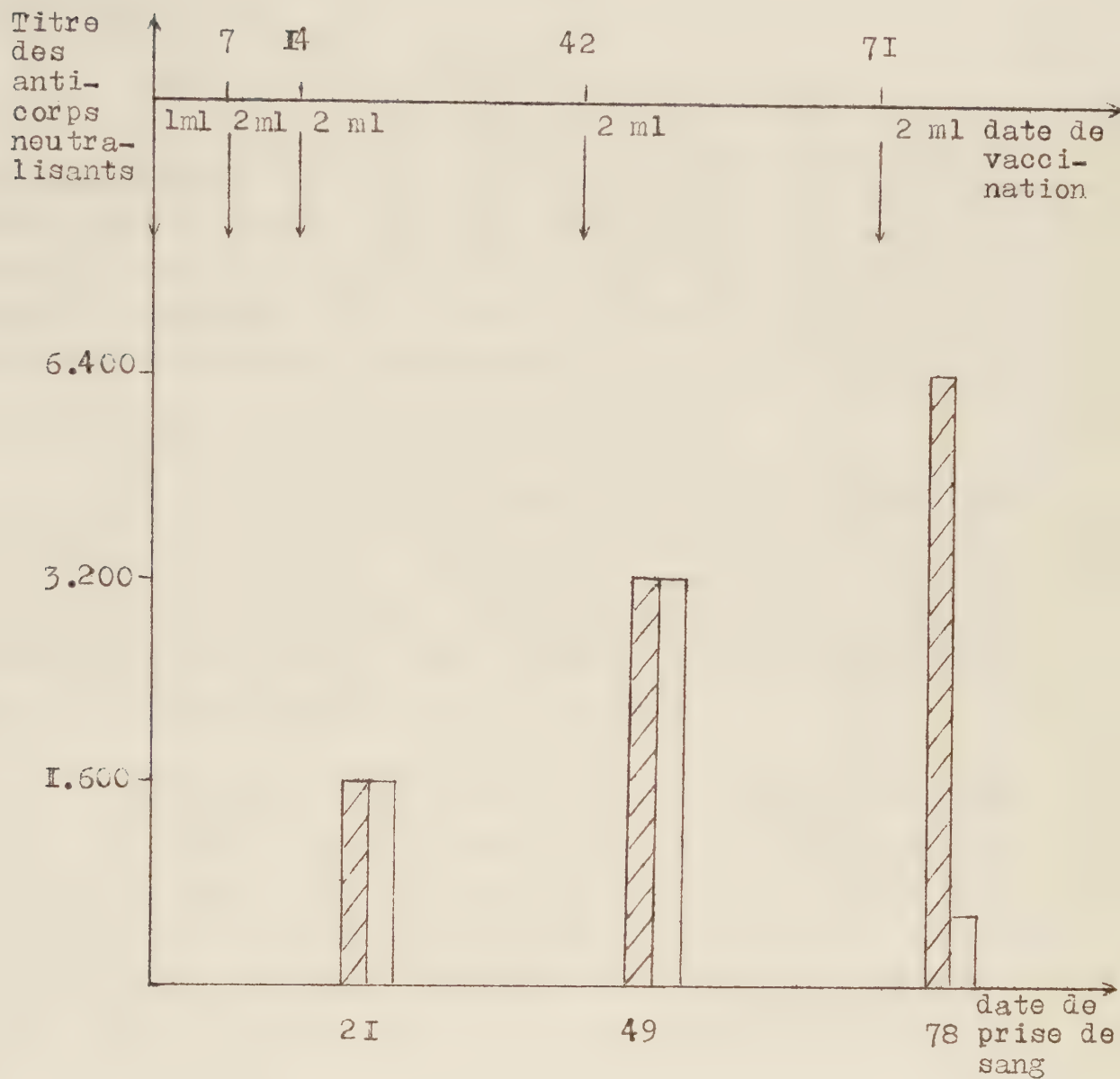
Le sérum de poule était un mélange des sérums prélevés 21, 49 et 77 jours après le début de l'immunisation selon la technique de FRENCH et Coll. (1960 - 35) et titrant respectivement 200, 300 et 400 en neutralisation (voir page 101). Il n'était pas floculant. Notons que EGGERS et Coll. (1961 - 27) signalent l'absence de pouvoir floculant de leurs sérums hyperimmunisés préparés sur singe. Dans le cas de notre sérum de poule, il semble probable que ce phénomène soit en rapport direct avec une mauvaise immunisation des animaux, les titres d'anticorps neutralisants restant très bas.

b)- Les sérums de lapin fournis par le Dr SABIN se sont montrés floculants vis-à-vis de nos antigènes (type 1) lorsqu'immunisés en type 1. Cette floculation semble relativement homotypique puisque nos antigènes ne donnaient avec les sérums de type 2 et de type 3 que des floculations douteuses. Par contre, le sérum de type 1 était encore floculant dilué au 1/64.

c)- Parmi les sérums de lapin immunisés en type 1 préparés au laboratoire, l'un d'eux s'est révélé floculant jusqu'à une dilution du 1/256. C'est le sérum que nous avons retenu comme témoin positif.

Le tableau 36 montre l'évolution des anticorps floculants et neutralisants au cours de l'immunisation de nos lapins. Il ressort que les deux

Evolution des anticorps neutralisants et flocculants
au cours de l'immunisation de lapins



anticorps neutralisants



anticorps flocculants (le titre flocculant est exprimé empiriquement en +)

sortes d'anticorps n'évoluent pas parallèlement et que les anticorps floculants disparaissent rapidement contrairement aux anticorps neutralisants.

2°/- Sérums humains

a)- Sujet n'ayant jamais eu d'infection poliomyélitique

Les sérums proviennent de quatre enfants avant vaccination par le vaccin buccal (BRIGAUD, 1963 - 14) et d'un adulte avant vaccination par voie parentérale. Ils sont considérés comme exempt de toute infection poliomyélitique préalable en raison de l'absence d'anticorps fixant le complément et surtout d'anticorps neutralisants. Aucun n'a manifesté de pouvoir floculant (tableau 37) Ils constituaient nos sérums témoins négatifs.

b)- Sujets en cours d'affection poliomyélitique

Six sérums (tableau 38) révèlent des taux significatifs en fixation du complément (TERRAILLON, 1964 - 123) soit en type 1 seulement, soit en type 1 et 3, soit en type 2 et 3, soit enfin dans les trois types. Tous se sont révélés floculants, ce qui confirme la présence d'anticorps floculants au cours de l'affection poliomyélitique et révèle l'hétérotypie de cette réaction de floculation, nos antigènes floculants étant tous de type 1.

c)- Sujets divers ne présentant pas d'affection récente poliomyélitique

Le tableau 39 montre que trois sur sept de ces sérums se sont montrés floculants. Cependant tous présentaient des anticorps neutralisants. Ne connaissant pas la date de leur contact avec le virus poliomyélitique, nous ne pouvons donc savoir si cette différence provient de l'ancienneté variable du contact ou s'il s'agit d'une variation dans la persistance des anticorps d'un sujet à l'autre.

d)- Vaccination et anticorps floculants

Certains auteurs (EGGERS et Coll. 1961 - 28, SELZIER et Coll. 1962 - 106, PACCAUD et Coll. 1960 - 77, SEGAGNI et Coll. 1960 - 104) ayant proposé la

TABLEAU 38

Sujets en cours d'affection poliomyélitique

	Floculation Type 1	Fixation du complément		
		Type 1	Type 2	Type 3
Con..	+	64	< 8	< 8
Nor..	+	32	< 8	< 8
Dim..	+	16	< 8	16
Bou..	+	< 8	32	≥ 64
Ste..	+	< 8	16	16
Avi..	+	128	64	64

TABLEAU 39

Sujets sans affection poliomyélitique récente

	Flocu- lation	Fixation du complément			Neutralisation		
	Type 1	Type 1	Type 2	Type 3	Type 1	Type 2	Type 3
Bos..	+	< 8	< 8	< 8	≥ 64	I6	I6
Sag..	+	< 8	< 8	< 8	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Ber..	+	< 8	< 8	< 8	< 6	≥ 96	< 6
Non..	0	< 8	< 8	< 8	I6	≥ 64	I6
Bou..	0	< 8	< 8	8	≥ 64	I6	I6
Fon..	0	< 8	< 8	8	≥ 64	I6	≥ 64
Pui..	0	< 8	< 8	< 8	≥ 64	I6	≥ 64

réaction de floculation pour le contrôle des vaccinations, nous avons utilisé des sérums provenant d'enfants vaccinés par le vaccin buccal (voir page 99).

Le tableau 40 montre que, malgré la présence d'anticorps neutralisants et d'anticorps fixant le complément, aucun ne s'est révélé floculant, soit que la vaccination par voie buccale ait été insuffisante pour provoquer l'apparition de ces anticorps, soit qu'ils soient à un titre trop faible pour être détectés avec nos antigènes.

Par contre, au cours de la vaccination classique d'un adulte par voie parentérale en trois injections, suivie d'un rappel par voie parentérale après quatre mois puis d'un rappel par voie buccale après un mois, le sérum de ce sujet se révélait floculant un mois après la prise du vaccin buccal (tableau 41).

TABLEAU 40

VACCINATION PAR VOIE BUCCALE :

sérums prélevés 84 jours après le début de la vaccination (*)

	FLOCCULATION	FIXATION DU COMPLEMENT			NEUTRALISATION		
	type 1	type 1	type 2	type 3	type 1	type 2	type 3
Av...	0	8	4	8	≥ 256	≥ 256	64
Conc...	0	< 8	≥ 32	≥ 64	16	≥ 256	128
Sanch...	0	< 8	16	32	≥ 256	≥ 256	≥ 256

(*) - Voir page 99.

TABLEAU 41

Vaccination par voie parentérale
et rappel par voie buccale

Avant le début de la vaccination				Un mois après le rappel par voie buccale			
Flocu- lation Type 1	Neutralisation			Flocu- lation Type 1	Neutralisation		
	Type 1	Type 2	Type 3		Type 1	Type 2	Type 3
0	I6	< 8	0	+	1024	64	I6

- DISCUSSION -

Nous avons mis en évidence des réactions de floculation spécifiques dans certains sérums animaux et humains.

1°/- L'immunisation fait apparaître chez le lapin des anticorps floculants spécifiques homotypiques qui n'évoluent pas parallèlement aux anticorps neutralisants, ce qui conduit à penser à une différence de nature de ces anticorps. Par contre, chez la poule, nous n'avons pas observé l'apparition d'anticorps, sans doute en raison d'une mauvaise immunisation.

2°/- Tous les sérums de sujets atteints de poliomyélite aiguë se sont révélés floculants en accord avec les auteurs (LE BOUVIER, 1957 - 58, SMITH et Coll. 1956 - 110, CHURCHER et Coll. 1959 - 21, PACCAUD et Coll. 1960 - 77, EGGERS et Coll. 1961 - 28, SELZER et Coll. 1962 - 106).

Notre étude ne nous permet pas d'apprécier l'évolution de ces anticorps. Selon les auteurs leur apparition semble précoce au cours de la maladie (deux jours après le début de la phase clinique pour EGGERS et Coll. (1961 - 28) et leur déclin rapide (SMITH et Coll. 1956 - 110, SCHMIDT et Coll. 1959 - 99) au cours de la convalescence, cette évolution n'étant pas forcément parallèle à celle des anticorps neutralisants (EGGERS et Coll. 1961 - 28).

3°/- Chez les sujets dits négatifs (absence d'anticorps fixant le complément et neutralisants) nous n'avons jamais observé de floculation, en accord avec EGGERS et Coll. (1961 - 28), alors que SELZER et Coll. (1962 - 106), GRASSET et Coll. (1962 - 44) et PACCAUD et Coll. (1960 - 77) citent respectivement 1, 3 et 1 cas de sérums floculants dépourvus d'anticorps neutralisants en utilisant la floculation en gélose.

4°/- Au cours d'une vaccination d'enfants par le vaccin buccal, nous n'avons pu observer l'apparition d'anticorps floculants alors qu'ils ont été nettement mis en évidence par EGGERS et Coll. (1961 - 28). Cette contradiction est probablement en rapport avec la qualité de nos antigènes sans doute moins actifs que ceux d'EGGERS et Coll., bien que leurs titres infectieux soient analogues.

5°/- Lors d'une vaccination par le vaccin injectable nous avons observé des anticorps flocculants un mois après l'injection de rappel alors que ce sujet ne possédait pas d'anticorps avant vaccination. Par contre, EGGERS et Coll. (1961 - 28) n'observent pas de flocculation chez six sur dix sujets développant des anticorps neutralisants dans les mêmes conditions. Pour SEGAGNI et Coll. (1960 - 104) la vaccination par le vaccin de Salk provoque une formation parallèle d'anticorps flocculants et neutralisants. De toute façon, il est difficile actuellement de tirer des conclusions sur les différents travaux, les dates de prélèvement des sérums et surtout les conditions techniques variant d'un auteur à l'autre.

6°/- En ce qui concerne les sujets "en bonne santé" mais ayant été antérieurement en contact avec le virus poliomyélitique (anticorps neutralisants) la réaction de flocculation s'est révélée positive dans trois cas sur sept dans notre étude. EGGERS et Coll. (1961 - 28) l'avaient observé dans quatre cas sur vingt-deux.

- CONCLUSIONS -

Notre technique de floculation, si elle à l'avantage d'être simple à mettre en oeuvre, présente le gros inconvénient de n'être pas quantitative. En effet, lorsque nous avons tenté d'introduire des dilutions de sérum dans notre réaction, les floculats observés n'étaient pas reproductibles pour une même dilution d'un jour à l'autre. Nous avons également observé un phénomène de zone au cours de ces dilutions. EGGERS et Coll. (1961 - 27) signalaient que certains sérums flocluaient plus volontiers avec un antigène dilué au 1/4 qu'avec le même antigène utilisé pur. C'est pourquoi nous nous sommes limités à une interprétation qualitative, les sérums étant désignés comme nettement floclulants (+) ou non.

De plus, nous avons souvent été gênés par la turbidité des sérums après conservation par congélation.

Par ailleurs, la présence possible d'anticorps non spécifiques anti-cellules observés en particulier chez les animaux hyperimmunisés nous ont obligé à utiliser des cellules de rein de singe pour la préparation des antigènes de floculation, sauf pour les sujets humains vaccinés pour lesquels nous avons utilisé des antigènes préparés sur cellules humaines cancéreuses, ces cellules n'étant jamais utilisées en vaccination chez l'homme.

De notre étude, il ressort que l'on peut mettre en évidence des anticorps floclulants spécifiques du virus poliomyélitique mais souvent hétérotypiques au cours d'une affection poliomyélitique.

Certains auteurs, au cours d'études plus approfondies et à l'aide d'antigènes sans doute de valeur supérieure aux nôtres, ont montré que la floculation pouvait être intéressante pour le diagnostic précoce de la maladie, les anticorps floclulants apparaissant avant ceux fixant le complément (SCHMIDT et Coll. 1959 - 99) et ceux neutralisants (BEGAGNI et Coll. 1960 - 104) ainsi

que pour l'étude de la réponse vaccinale au vaccin injectable (SEGAGNI et Coll. 1960 - 104, EGGERS et Coll. 1961 - 28, SMITH et Coll. 1959 - 111, PACCAUD et Coll. 1960 - 77) ou au vaccin vivant atténué (EGGERS et Coll. 1961 - 28, SELMER et Coll. 1962 - 106).

Mais ces auteurs ont également observé une persistance variable des anticorps d'un individu à l'autre (SEGAGNI et Coll. 1960 - 104), des réactions hétérotypiques inconstantes pour des mêmes conditions techniques (EGGERS et Coll. 1961 - 28) et surtout quelques réactions non spécifiques inexplicées (AUBERT et Coll. 1962 - 6, EGGERS et Coll. 1961 - 28) en dehors des anticorps anti-cellules.

Dans les conditions actuelles, la réaction de floculation ne semble donc pas devoir supplanter les réactions de fixation du complément et de neutralisation pour le diagnostic de la poliomyélite.

*

*

*

- C O N C L U S I O N S -

Si la réaction de fixation du complément est encore peu utilisée pour le diagnostic de la poliomyélite alors que cette méthode rend de très grands services pour le diagnostic des autres infections à virus, c'est en raison des difficultés rencontrées pour la préparation des antigènes.

Nous nous sommes proposés de comparer les techniques qui ont été employées et de rechercher les facteurs qui interviennent pour la production d'antigènes valables.

Des recherches effectuées au Laboratoire d'Hygiène et du bilan auquel nous avons procédé concernant trois méthodes, il ressort essentiellement que :

- la méthode de SVEDMYR ne comportant pas l'ultrafiltration et utilisant les cellules Hela ne nous a donné que 7 antigènes utilisables sur 17 préparés, le défaut majeur étant le pouvoir anticomplémentaire;

- une méthode inspirée de celle de SCHMIDT et LENNETTE peut fournir de bons antigènes; toutefois sur 58 antigènes préparés dans notre laboratoire, 8 seulement ont été satisfaisants, les autres ayant soit une antigénicité insuffisante, soit un pouvoir anticomplémentaire.

Les différents facteurs pouvant intervenir dans la qualité de ces antigènes (milieu de survie, temps de contact virus-cellules, origine des sérums animaux, sérum de cobaye ajouté destiné à réduire le pouvoir anticomplémentaire) ont été étudiés; aucun d'entre eux n'a paru jouer un rôle important. Toutefois le fait que nous n'ayons pas utilisé le milieu M 199 employé par SCHMIDT et LENNETTE explique peut être les différences entre leurs résultats et les nôtres;

- une méthode voisine de celle de ARTZEL, en fournissant 69 antigènes utilisables sur 112 préparés, est apparue la plus satisfaisante.

Elle comporte essentiellement l'utilisation de cellules Hela ou HEp2, un milieu à l'hydrolysate de lactalbumine, enfin l'emploi des souches Sabin atténuées supprimant les risques encourus par la manipulation d'antigènes vivants contenant des souches sauvages. Ces dernières donnent pour le type 1 et 2 des résultats un peu plus satisfaisants alors que l'inverse s'observe pour le type 3. Parmi les facteurs pouvant améliorer la qualité des antigènes figurent en

particulier la réduction du volume de milieu de survie.

Les différentes méthodes de concentration ont été exposées. Celles que nous avons utilisées ne nous pas donné de résultats satisfaisants.

La méthode de floculation proposée par EGGERS et SABIN a été étudiée. Les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants mais le nombre d'expériences auxquelles nous avons procédé ne nous permet pas de donner actuellement d'appréciation sur sa valeur.

Le Président de la Thèse :

Pr. R. SOHIER,

VU, le Doyen :
J.F. CIER,

VU et permis d'imprimer
LYON, le 1er décembre 1964
Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS,

*

*

*

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1 - ALBANO (A.).- Uber einige einfache methoden zur konzentration von viren.-
Zent. f. Bakt., 1961, 181, 451-455.
- 2 - ALBERTSSON (P.A.).- Partition of cell particles and macromolecules.-
Almqvist et Wiksells, Uppsala, 1960.
- 3 - ARTZET (F.).- Antigène herpétique fixant le complément.-
Ann. Inst. Past., 1960, 99, 777-783.
- 4 - ARTZET (F.).- Antigène poliomyélitique pour fixation du complément.-
Ann. Inst. Past., 1960, 99, 852-858.
- 5 - ARTZET (F.).- Recherches sur les antigènes viraux fixant le complément. Etu-
de des virus herpétique et poliomyélitique.-
Thèse de Sciences Nat., Paris, 1961.
- 6 - AUBERT (E.), PAVILANIS (V.) et STAREY (D.H.).- Virus antibody titrations
using latex suspension.-
Canadian J. of Public Health, 1962, 53, 206-211.
- 7 - BARON (S.).- Ultracentrifuge concentration of poliovirus and effect of calf
serum and gelatin.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1957, 95, 760-764.
- 8 - BAUMEISTER (J.) et MILLER (C.A.).- The preparation of poliomyelitis comple-
ment fixing antigens from infected tissue culture fluids.-
J. Inf. Dis., 1956, 98, 27 - 32.
- 9 - BEALE (A.J.) et MASON (P.J.).- The measurement of the D-antigen in poliovi-
rus preparations.-
J. Hyg. Camb., 1962, 60, 113-121.
- 10 - BLACK (F.L.) et MELNICK (J.L.).- The Specificity of the complement fixing
test in poliomyelitis.-
Yale J. Biol. Med., 1954, 26, 385-393.

- 11 - BLACK (F.L.) et MELNICK (J.L.).- Appearance of soluble and cross reactive complement-fixing antigens on treatment of poliovirus with formalin.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 353-355.
- 12 - BOER de (C.J.) et COX (H.R.).- Specific complement-fixing diagnostic antigens for neurotropic viral diseases.-
J. Immunol., 1947, 55, 193-204.
- 13 - BOERNER (F.) et LUKENS (M.).- Method for determining optimum dose and sensitivity of antigens used in Wassermann test.-
Amer. J. Clin. Patho., 1937, 7, 33-41.
- 14 - BRIGAUD - CHIDAINE (M.).- Vaccination antipoliomyélitique dans une pouponnière par le vaccin vivant trivalent (souches Sabin).-
Thèse Méd. Lyon, 1963.
- 15 - EUCCA (M.A.), CASEY (H.L.) et WINN (J.F.).- Method of concentration of viral diagnostic reagents using hydrophilic agents.-
Proc. Exp. Soc. Biol. Med., 1960, 104, 247-250.
- 16 - CASALS (J.).- Acetone-ether extracted antigens for complement fixation with certain neurotropic viruses.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 70, 339-343.
- 17 - CASALS (J.) et OLITSKY(P.K.).- A complement-fixation test for poliomyelitis virus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 75, 315-318.
- 18 - CASALS (J.), OLITSKY (P.K.) et ANSLOW (R.O.).- Adaptation for a Lansing strain of poliovirus to newborn mice.-
J. Exp. Med., 1951, 94, 111-121.
- 19 - CASALS (J.), OLITSKY (P.K.) et ANSLOW (R.O.).- A specific complement-fixation test for infection with poliomyelitis virus.-
J. Exp. Med., 1951, 94, 123-137.
- 20 - CHARNEY (J.), MACHLOWITZ (R.), TYTELL (A.), SAGIN(J.) et SPICER (D.).- The concentration and purification of poliomyelitis virus by the use of nucleic acid precipitation.-
Virology, 1961, 15, 269-280.

- 21 - CHURCHER (G.M.), SHEFFIELD (F.W.) et SMITH (W.).- Poliomyelitis virus flocculation: the reactivity of unconcentrated cell-culture fluids.-
Brit. J. Exp. Path., 1959, 40, 87-95.
- 22 - DULBECCO (R.) et VOGT (M.).- Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.-
J. Exp. Med., 1954, 99, 167-182.
- 23 - DUVE de (C.) et BERTHET (J.).- Reproducibility of differential centrifugation experiments in tissue fractionation.-
Nature, 1953, 172, 1, 142.
- 24 - EAGLE (H.).- Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 362-364.
- 25 - EAGLE (H.).- Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.-
Science, 1955, 122, 501-504.
- 26 - ECKERT.- Veber das akute Stadium der epidemischen Kinderlähmung nebst Bekanntgabe eines Falles von Poliomyelitis fulminans.-
Deutsche Med. Wchnshr, 1911, 37, 113-116.
- 27 - EGGERS (H.J.) et SABIN (A.B.).- A phase contrast microprecipitin test with poliovirus antigens .I.-
Archiv. Ges. Virusforsch, 1961, 11, 1, 120-151.
- 28 - EGGERS (H.J.) et SABIN (A.B.).- A phase contrast microprecipitin test with poliovirus antigens.II.-
Archiv. Ges. Virusforsch., 1961, 11, 1, 152-175.
- 29 - ENDERS (J.F.), WELLER (T.H.) et ROBBINS (F.C.).- Cultivation of the Lansing strain of poliovirus in cultures of various human embryonic tissues.-
Science, 1949, 109, 85-87.
- 30 - ENDERS (J.F.).- Bovine amniotic fluid as tissue culture medium in cultivation of poliomyelitis and other virus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 82, 100-101.

- 31 - FANTES (K.H.).- Concentration and partial purification of poliomyelitis virus.-
J. Hyg., 1962, 60, 1, 123-133.
- 32 - FJELDE (A.).- Human tumor cells in tissue culture.-
Cancer, 1955, 8, 845-851.
- 33 - FLEXNER (S.) et NOGUCHI (H.).- Experiments on the cultivation of the micro-organism causing epidemic poliomyelitis.-
J. Exp. Med., 1913, 18, 461-485.
- 34 - FOGH (J.).- Latent period in monkey kidney and Hela cell monolayer cultures infected with poliomyelitis virus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 494-497.
- 35 - FRENCH (R.C.), MOREAU (P.) et VAROSH (W.).- The rapid production of antiserum against attenuated polioviruses.-
Canadian J. Microbiol., 1960, 6, 599-603.
- 36 - GAUDIN-TERRASSE (G.).- La culture des cellules amniotiques humaines et leur emploi en virologie. Etude critique des méthodes proposées et résultats obtenus avec une technique personnelle.-
Thèse Med., Lyon, 1960.
- 37 - GAY (F.P.) et LUCAS (W.P.).- Anteriotpoliomyelitis. Methods of diagnosis from spinal fluid and blood in monkeys and human beings.-
Arch. Int. Med. (Chicago), 1910, 6, 330-338.
- 38 - GEY (G.O.).- An improved technic for massive tissue culture.-
Amer. J. Cancer, 1933, 17, 752-756.
- 39 - GEY (G.O.) et GEY (M.K.).- The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. I - Preliminary report : cultivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes on methods of cultivation.-
Amer. J. Cancer, 1936, 27, 45-76.
- 40 - GEY (G.O.), COFFMAN (W.D.) et KUBICEK (M.T.).- Tissue culture studies of the proliferating capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.-
Kc. Res., 1952, 12, 264-265.

- 41 - GILDEMEISTER (E.).- Über die Züchtung des poliomyelitisvirus im Künstlichen Nährmedium.-
Deutsche Med. Wchnschr, 1933, 59, 877-879.
- 42 - GINSBERG (H.S.), GOLD (E.) et JORDAN (W.S.).- Tryptose phosphate broth as supplementary factor for maintenance of Hela cell-tissue cultures.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 66-71.
- 43 - GRASSET (E.), BONIFAS (V.) et PONGRATZ (L.).- Rapid slide precipitin micro-reaction of poliomyelitis antigens and antisera in agar.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 97, 72-77.
- 44 - GRASSET (N.).- Méthode simplifiée pour la préparation des antigènes poliomyélitiques décelables par la précipitation en gel.-
Ann. Inst. Past., 1962, 103, 911-917.
- 45 - GRASSET (N.) et SCHLAEFFER (J.).- Recherche des antigènes des virus coxsackie B au moyen de la précipitation en gel.-
Ann. Inst. Past., 1962, 103, 917-920.
- 46 - GROSSOWICZ (M.), MERCADO (A.) et GOLDBLUM (N.).- A simple method for concentration of live and formaldehyde inactivated poliovirus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 103, 872-874.
- 47 - HALONEN (P.) et HUEBNER (R.J.).- Echo and poliomyelitis virus antisera prepared in guinea pigs with fluorocarbo-treated cell culture antigens.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 105, 46-49.
- 48 - HAMPARIAN (V.V.), MULLER (F.) et HUMMELER (K.).- Elimination of non specific components from viral antigens by fluorocarbon.-
J. Immunol., 1958, 80, 6, 468-475.
- 49 - HARRISON (J.A.).- Complement-fixation and precipitation tests in poliomyelitis.-
J. Immunol., 1939, 37, 233-244.
- 50 - HOYER (B.H.), BOLTON (E.T.), ORMSBEE (R.A.), LE BOUVIER (G.), RITTER (D.) et LARSON (C.L.).- Mammalian viruses and rickettsiae. Their purification and recovery by cellulose anion exchange columns has significant implications.-
Science, 1958, 127, 859-863.

- 51 - HOYER (B.H.), BOLTON (E.T.), RITTER (D.B.) et RIBI (E.).- Simple method for preparation of purified radioactive poliovirus particles : electron micrograph.-
Virology, 1959, 7, 461-464.
- 52 - KENNA Mc (J.), ZUSCHEK (F.) et FRANKEL (J.W.).- An hemagglutination test for the titration of antibodies to polioviruses.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 97, 160-163.
- 53 - KOLMER (J.A.) et FRAESE (A.E.).- Complement fixation in acute anterior poliomyelitis.-
J. Immunol., 1917, 2, 327-339.
- 54 - KOLMER (J.A.) et RILEY (A.M.).- Tests for immunity to acute anterior poliomyelitis. III - Colloidal gold, complement fixation and precipitation tests.-
J. Immunol., 1935, 29, 199-208.
- 55 - LAHELLE (O.).- Complement-fixation test for the Lansing strain of poliomyelitis virus.-
Amer. J. Hyg., 1951, 54, 391-401.
- 56 - LE BOUVIER (G.L.).- Observations of the poliomyelitis complement fixation test.-
Brit. J. Exp. Path., 1953, 34, 300-318.
- 57 - LE BOUVIER (G.L.), SCHWERDT (C.E.) et SCHAFFER (F.L.).- Specific precipitation in agar with purified poliovirus.-
Virology, 1957, 4, 590-593.
- 58 - LE BOUVIER (G.L.).- Poliovirus precipitins. A study by means of diffusion in agar.-
J. Exp. Med., 1957, 106, 661-676.
- 59 - LEBREDO (M.G.) et RECIO (A.).- Poliomyelitis anterior aguda epidemica; epidemia de Cuba.-
San. Benefic. Bol. Opic., Habana, 1910, 3, 170-204.

- 60 - LEDINKO (N.), RIORDAN (J.T.) et MELNICK (J.L.).- Differences in cellular pathogenicity of two immunologically related polioviruses as revealed in tissue culture.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 83-88.
- 61 - LEKA (D.), MORET (R.), SOHIER (R.) et TIGAUD (J.).- Concentration des liquides amniotiques et allantoïques infectés par des virus, au moyen de la dialyse contre le polyvinylpyrrolidone.-
Ann. Inst. Past., 1956, 90, 770-778.
- 62 - LEVADITI (C.).- Symbiose entre le virus de la poliomyélite et les cellules des ganglions spinaux, à l'état de vie prolongée in vitro.-
Compt. Rend. Soc. Biol., 1913, 74, 1179.
- 63 - LEVADITI (C.).- Virus de la poliomyélite et culture des cellules in vitro.-
Compt. Rend. Soc. Biol., 1913, 75, 202-205.
- 64 - LEVINTOW (L.) et DARNELL (J.E.).- A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus : characterization and amino acid analysis of type 1 poliovirus.-
J. Biol. Chem., 1960, 235, 70-73.
- 65 - LORING (H.S.) et SCHWERDT (C.E.).- Studies of the purification of poliomyelitis virus. I- Yields and activity of preparations obtained by differential centrifugation.-
J. Exp. Med., 1942, 75, 395-406.
- 66 - LORING (H.S.) et SCHWERDT (C.E.).- Isolation of macromolecular constituent with properties of Lansing strain of poliomyelitis virus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1946, 62, 289-291.
- 67 - LORING (H.S.), RAFFEL (J.) et ANDERSON (J.C.).- Complement-fixation in experimental and human poliomyelitis.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1947, 66, 385-392.-
- 68 - MANSON (L.A.), ROTHSTEIN (E.L.) et RAKE (G.W.).- Purification of poliovirus with fluorocarbon.-
Science, 1957, 125, 546-547.

- 69 - MAYER (M.M.), CROFT (C.C.) et GRAY (M.M.).- Kinetic studies on immune hemolysis; method.-
J. Exp. Med., 1948, 88, 427-444.
- 70 - MERRILL (M.H.).- The mass factor in immunological studies upon viruses.-
J. Immun., 1936, 30, 169-184.
- 71 - MILZER (A.), LEVINSON (S.O.), VANDERBOOM (K.) et ADELMAN (P.).- Cultivation of poliomyelitis virus (Lansing strain) in human embryonic and placental tissues.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 74, 136-138.
- 72 - MOORE (A.E.), SABACHEWSKY (L.) et TOOLAN (H.W.).- Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells.-
Cancer Res., 1955, 15, 1-9.
- 73 - MORIT (R.), BOUCHERLE (A.) et LAMBERT (H.).- Caractères de la dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone à travers une suspension de cellophane.-
Compt. Rend. Soc. Biol., 1955, 149, 719-721.
- 74 - MORGAN (J.F.), MORTON (H.J.) et PARKER (R.C.).- Nutrition of animal cells in tissue culture. I- Initial studies on a synthetic medium.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73, 1-8.
- 75 - NEUSTAEDTER (M.) et BANZHAF (E.J.).- Complement fixation with a specific antigen in acute poliomyelitis.-
J. Infect. Dis., Chicago, 1917, 21, 515-522.
- 76 - PACCAUD (M.F.), PONGRATZ (E.) et SCHLAEFFER (J.).- La microréaction de flocculation sur lame par la technique de double diffusion en agar entre anticorps et antigènes poliomyélitiques. I-Etude de la réaction.-
Archiv. Ges. Virusforsch., 1960, 10, 3, 335-350.
- 77 - PACCAUD (M.F.), PONGRATZ (E.) et SCHLAEFFER (J.).- La microréaction de flocculation sur lame par la technique de double diffusion en agar entre anticorps et antigènes poliomyélitiques. II- Etude comparative des anticorps neutralisants, fixant le complément et flocculants.-
Archiv. Ges. Virusforsch., 1960, 10, 3, 351-360.

- 78 - PAPAPANAGIOTOU (J.) et Von MAGNUS (H.).- Complement fixation with formalin treated poliovirus antigens.-
Acta Path. Microb. Scand., 1961, 53, 363-374.
- 79 - PHILIPSON (L.), ALBERSON (A.) et FRICK (G.).- The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems.-
Virology, 1960, 11, 553-571.
- 80 - PLAN (R.) et FAYET (M.T.).- Sur l'emploi de la polyvinylpyrrolidone et des polyéthylène-glycols pour la concentration des solutions biologiques.-
A.B.C., 1961, 1-2 , 169-170.
- 81 - POLLARD (M.), CONNOLLY (J.) et STANLEY (F.).- The precipating effect of methanol on viruses.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 71, 290-293.
- 82 - POLLARD (M.).- The serological responso of cotton rats and monkeys to poliomyelitis virus.-
J. Immunol., 1951, 67, 463-470.
- 83 - POLLARD (M.).- Preparation of specific complement-fixing antigens with Lansing poliomyelitis virus.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 388-392.
- 84 - POLLARD (M.), HSIANG (C.M.) et SHARP (G.R.).- Preparation of specific complement-fixing antigens from the three prototypes of poliomyelitis viruses.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 79, 48-50.
- 85 - POLSON (A.) et HAMPTON (J.W.F.).- Studies on poliomyelitis virus. Concentration and purification of the virus.-
J. Hyg., 1957, 55, 344-346.
- 86 - RAFFTEL (S.) et SCHULTZ (E.W.).- Immunological reactions in poliomyelitis.-
J. Immunol., 1940, 39, 265-286.
- 87 - REED (L.J.) et MULENCH (H.).- Simple method of estimation fifty per cent end points.-
Am. J. Hyg., 1938, 27, 493-497.

- 88 - ROBBINS (F.C.), ENDERS (J.F.) et WELLER (T.H.).-Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses "in vitro" of human embryonic tissues.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 75, 370-374.
- 89 - ROBBINS (F.C.), ENDERS (J.F.), WELLER (T.H.) et FLORENTINO (G.L.).- Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V -
The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis.-
Am. J. Hyg., 1951, 54, 286-293.
- 90 - SABIN (A.B.).- Experiments on the purification and concentration of the virus of poliomyelitis.-
J. Exp. Med., 1932, 56, 307-317.
- 91 - SABIN (A.B.) et OLITSKY (P.K.).- Cultivation of poliomyelitis virus in vitro in human embryonic nervous tissue.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1936, 34, 357-359.
- 92 - SANDERS (M.) et JUNGBLUT (C.W.).- Studies in rodent poliomyelitis.II-
Cultivation of the murine strain of SK poliomyelitis virus.-
J. Exp. Med., 1942, 75, 631-649.
- 93 - SCHERER (W.F.), BUTORAC (G.) et SYVERTON (J.T.).- Cultivation of poliomyelitis virus in monkey testicular tissue.-
Fed. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 10, 417.
- 94 - SCHERER (W.F.), SYVERTON (J.T.) et GEY (G.O.).- Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV- Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain Hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix.-
J. Exp. Med., 1953, 97, 695-709.
- 95 - SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.).- A complement fixation test for poliomyelitis.-
J. Exp. Med., 1955, 102, 133-150.
- 96 - SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.).- Modification of the homotypic specificity of poliomyelitis complement fixing antigens by heat.-
J. Exp. Med., 1956, 104, 99-120.

- 97 - SCHMIDT (N.J.), LENNETTE (E.N.), DOLEMAN (J.H.) et HAGENS (S.J.).- Factors influencing the potency of poliomyelitis complement fixing antigens produced in tissue culture systems.-
Am. J. Hyg., 1957, 66, 1-19.
- 98 - SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.).- An inquiry into the use of complement fixation test for the typing of poliomyelitis viruses.-
Am. J. Hyg., 1957, 66, 119-130.
- 99 - SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.).- A microflocculation test for poliomyelitis : with observations on the flocculating antibody response in human poliomyelitis.-
Am. J. Hyg., 1959, 70, 51-65.
- 100 - SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.).- Recent advances in the serodiagnosis of virus infections.-
Prog. Med. Virol., 1961, 3, 19-94.
- 101 - SCHOTTMULLER (H.).- Der liquor cerebrospinalis bei infektionskrankheiten, insbesondere im zusammenhang mit der Wassermannschen Reaktion by poliomyelitis acuta epidemica.-
Münch. Med. Wchnshr., 1912, 59, 1988-1992.
- 102 - SCHULTZ (E.W.), GEBHARDT (L.P.) et BULLOCK (L.T.).- Studies on the antigenic properties of the ultraviruses. VII- Nature of the viricidal antibody in antipoliomyelitis serum.-
J. Immunol., 1931, 21, 171-198.
- 103 - SCHWERDT (C.E.) et SCHLAFFER (F.L.).- Purification of poliomyelitis viruses propagated in tissue culture.-
Virology, 1956, 2, 665-678.
- 104 - SEGACCI (E.), NIGRO (N.), ANSALDI (N.) et CROSATO (M.).- La reazione di flocculazione nello studio dell'immunità antipoliomielitica acquisita mediante vaccinazione con vaccino Salk.-
Minerva Pediatrica, 1960, 12, 3-12.

- 105 - SELZER (G.) et POLSON (A.).- Dispersion analyses of the MEF1 strain of poliomyelitis virus.-
Bioch. Biophys. Act., 1954, 15, 251-257.
- 106 - SELZER (G.) et BUTCHART (M.).- A precipitin test for acute poliomyelitis and for assessing antibody response to oral poliovaccine.-
J. Hyg., 1962, 60, 69-78.
- 107 - SMITH (W.M.), CHAMBERS (V.C.) et EVANS (C.A.).- Growth of neurotropic viruses in extraneural tissues. Preliminary report on propagation of poliomyelitis virus (Lansing and Hof strains) in cultures of human testicular tissue.-
Northwest Med., 1950, 49, 368-373.
- 108 - SMITH (W.M.), CHAMBERS (V.C.) et EVANS (C.A.).- Growth of neurotropic viruses in extraneural tissues. IV - Poliomyelitis virus in human testicular tissue "in vitro".-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 76, 696-700.
- 109 - SMITH (W.), SHEFFIELD (F.W.) et LEE (L.H.).- A specific virus-antibody flocculation reaction with poliomyelitis viruses.-
Lancet, 1956, 270, 710-713.
- 110 - SMITH (W.), SHEFFIELD (F.W.), CHURCHER (G.) et LEE (L.H.).- Poliomyelitis virus flocculation by a micromethod.-
Lancet, 1956, 271, 163-165.
- 111 - SMITH W.M.), BOLESARD (G.P.B.) et CHURCHER (G.M.).- Poliomyelitis virus flocculation reaction. Behaviour of sera of cases and vaccinated individuals.-
Lancet, 1959, 2, 586-591.
- 112 - SCHIER (R.), PEILLARD (M.M.), GINESTE (J.) et FREYDIER (J.).- Microméthode en tubes pour la réaction de fixation du complément appliquée au diagnostic des infections à virus.-
Ann. Biol. Clin., 1956, 3-4, 1-10.
- 113 - SUGGS (M.T.), CASEY (H.L.), SLIGH (D.D.), FODOR (A.R.) et Mc LIMANS (W.F.).- A batch-type concentration and purification procedure for poliovirus complement fixing antigen.-
J. Bact., 1961, 82, 5, 789-791.

- 114 - SVEDMYR (A.), ENDERS (J.F.) et HOLLOWAY (A.).- Complement fixation with Brunhilde and Lansing poliomyelitis viruses propagated in tissue culture.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 79, 296-300.
- 115 - SVEDMYR (A.), ENDERS (J.F.) et HOLLOWAY (A.).- Complement-fixation with the 3 types of poliomyelitis virus propagated in tissue culture.-
Am. J. Hyg., 1953, 57, 60-70.
- 116 - SVEDMYR (A.) et KJELLEN (L.).- Further experience with the CF reaction in poliomyelitis with antigens derived from tissue cultures.-
Proc. VI Internat. Congr. Microbiol. Rome, 1953, 3, 176-180.
- 117 - SVEDMYR (A.), 1957, communication personnelle.
- 118 - SYVERTON (J.T.), SCHERER (W.F.) et BUTORAC (G.).- Propagation of poliomyelitis virus in cultures of monkey and human testicular tissues.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 77, 23-28.
- 119 - SYVERTON (J.T.) et SCHERER (W.).- Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses.- I - Viral multiplication in tissue cultures employing monkey and human testicular cells.-
J. Exp. Med., 1952, 96, 355-367.
- 120 - SYVERTON (J.T.) et SCHERER (W.F.).- Utilisation of a stable strain of human epithelial cells (Hela Gey) for diagnosis of poliomyelitis.-
Fed. Proc., 1953, 12, 462.
- 121 - SYVERTON (J.T.), SCHERER (W.F.) et ELWOOD (P.M.).- Studies on propagation in vitro of poliomyelitis viruses; application of strain Hela human epithelial cells for isolation and typing.-
J. Lab. Clin. Med., 1954, 43, 286-302.
- 122 - TAYLOR (J.) et GRAHAM (A.F.).- Purification of poliovirus labeled with radiophosphorus.-
Virology, 1958, 6, 488-498.
- 123 - TERRAILLON (J.).- La réaction de fixation du complément dans l'infection poliomyélitique naturelle et expérimentale.-
Thèse de Pharmacie, Lyon, 1964.-

- 124 - Van Der VEEN (J.), BOTS (L.) et MES (A.).- Establishment of two human cell strains from kidney and reticulosarcoma in ling.-
Arch. Ges. Virusforsch., 1958, 8, 2, 230-238.
- 125 - WARREN (J.), HARE (J.D.) et GOLDMAN (C.).- Complement-fixing antigens of living and inactivated poliovirus.II- Complement fixation activity of poliomyelitis vaccine and its relation to immunogenic potency.-
Am. J. Publ. Health, 1959, 49, 53-61.
- 126 - WELLER (T.H.), ROBBINS (F.C.) et ENDERS (J.).- Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 72, 153-155.
- 127 - WELLER (T.H.), ENDERS (J.F.), ROBBINS (F.C.) et STODDARD (M.B.).- Studies on the cultivation of polioviruses in tissue culture. I- The propagation of polioviruses in suspended cell cultures of various human tissues.-
J. Immunol., 1952, 69, 645-671.
- 128 - WOLLSTEIN (M.).- A biological study of the cerebrospinal fluid in anterior poliomyelitis.-
J. Exp. Med., 1908, 10, 476-483.
- 129 - WOOD (W.), FRANKLIN (A.E.), CLARK (E.M.), DUNCAND et RHODES (A.J.).- Cultivation of poliomyelitis virus in tissue culture.III- Synthetic medium in roller tube cultures.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 81, 434-438.
- 130 - YOUNGNER (J.S.), WARD (E.N.) et BALK (J.E.).- Studies on poliomyelitis viruses in cultures of monkey testicular tissue.I- Propagation of virus in roller tubes.-
J. Hyg., 1952, 55, 291-300.
- 131 - YOUNGNER (J.S.).- Monolayer tissue cultures.I- Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells.-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 85, 202-205.

- 132 - Von ZEIPPEL (G.).- Prevention and removal of anticomplementary activity of tissue culture fluids.-
Arch. Ges. Virusforsch., 1958; 8, 246-258.
- 133 - LE BOUVIER (G.L.).- The modification of poliovirus antigens by heat and ultraviolet light.-
Lancet, 1955, 1013-1016.

*

*

*

- TABLE DES MATIERES -

<u>INTRODUCTION</u>	1
 <u>CHAPITRE I : ETUDE DES ANTIGENES POLIOMYELITIQUES FIXANT LE COMPLEMENT</u>	
- Introduction - Historique	4
- Matériels et méthodes utilisés pour la préparation et le titrage des antigènes étudiés.....	11
A - Matériel pour l'obtention des antigènes.....	11
B - Méthode de titrage des antigènes utilisés.....	15
- Résultats.....	26
A - Antigènes bruts.....	25
B - Antigènes concentrés.....	48
- Conclusions.....	74
 <u>CHAPITRE II : ESSAIS DE CONCENTRATION ET PURIFICATION DES ANTIGENES</u>	
- Introduction.....	77
A - Méthode des deux phases.....	79
B - Lyophilisation.....	80
C - Traitement par le chlorure de cobalt.....	82
D - Dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone	82
E - Ultracentrifugation.....	86
- Conclusions.....	93
 <u>CHAPITRE III: ESSAIS DE FLOCCULATION AVEC LE VIRUS POLIOMYELITIQUE</u>	
- Introduction.....	95
- Matériel.....	97

I - Antigènes.....	97
II - Sérums.....	98
III - Diluant	101
- Méthode de floculation.....	102
- Résultats.....	103
A - Témoins.....	103
B - Les sérums expertisés.....	104
- Discussion.....	113
- Conclusions.....	115
<u>CONCLUSIONS</u>	117
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	120

